

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
9 juin 2005 (09.06.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/051417 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 38/21, 9/10, A61P
35/00, A61K 47/48, 9/14, 38/20, 47/42

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/050605

(22) Date de dépôt international :
19 novembre 2004 (19.11.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0350886 21 novembre 2003 (21.11.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33, avenue du
Docteur Georges Lévy, F-69200 Venissieux (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
POULIQUEN, Gauthier [FR/FR]; 47, rue Lortet,
F-69007 Lyon (FR). **MEYRUEIX, Rémi** [FR/FR]; 42, rue
Hector Berlioz, "Le Bois Saint-Rambert", F-69009 Lyon
(FR). **SOULA, Olivier** [FR/FR]; Castel du Grand Large,
115, avenue du Carreau, F-69330 Meyzieu (FR).

(74) Mandataires : **FLEURANCE, Raphaël** etc.; Cabinet
Plasseraud, 65/67, rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex
09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: PHARMACEUTICAL FORMULATIONS FOR THE SUSTAINED RELEASE OF INTERFERONS AND THERAPEUTIC APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : FORMULATIONS PHARMACEUTIQUES POUR LA LIBERATION PROLONGEE D'INTERFERONS ET LEURS APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

(57) Abstract: The invention relates to novel pharmaceutical formulations based on fluids and stable aqueous colloidal suspensions for the sustained release of interferon IFN- (and one or more other optional active principles), and to the applications, particularly the therapeutic applications, of said formulations. The invention aims to provide a fluid pharmaceutical formulation for the sustained release of interferon(s) (and one or more other optional active principles), such that, following parenteral injection, the *in vivo* interferon release time is increased significantly, while the plasma concentration peak thereof is lowered. Moreover, said formulation must be storage stable and, in addition, biocompatible, non-toxic biodegradable, non-immunogenic and well tolerated locally. According to the invention, the formulation is a low-viscosity aqueous colloidal suspension of submicronic particles of water-soluble, biodegradable polymer PO bearing hydrophobic groups (GH). The aforementioned particles are noncovalently associated with at least one interferon (and one or more other optional active principles) and form a gelled deposit on the injection site, said gelling being caused by a protein present in the physiological medium.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouvelles formulations pharmaceutiques à base de suspensions colloïdales aqueuses stables et fluides pour la libération prolongée d'interféron -IFN- (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels), ainsi que les applications, notamment thérapeutiques, de ces formulations. Le but de l'invention est de proposer une formulation pharmaceutique fluide pour la libération prolongée d'interféron(s) (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels), permettant après injection par voie parentérale d'accroître significativement la durée de libération *in vivo* des interférons, tout en diminuant le pic de concentration plasmatique de cet IFN, ladite formulation se devant par ailleurs d'être stable à la conservation et de surcroît biocompatible, biodégradable non-toxique, non-immunogène et bien tolérée localement. La formulation selon l'invention est une suspension colloïdale aqueuse de basse viscosité, de particules submicroniques de polymère PO biodégradable, hydrosoluble et porteur de groupements hydrophobes (GH), lesquelles particules étant associées de façon non covalente avec au moins un interféron (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels) et formant un dépôt gélifié sur le site d'injection, cette gélification étant provoquée par une protéine présente dans le milieu physiologique.

WO 2005/051417 A1



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

FORMULATIONS PHARMACEUTIQUES POUR LA LIBERATION PROLONGEE D'INTERFERONS ET LEURS APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

5 La présente invention concerne de nouvelles formulations pharmaceutiques à base de suspensions colloïdales aqueuses stables et fluides pour la libération prolongée de principes actifs protéiniques, à savoir les interférons (IFN), ainsi que les applications thérapeutiques, de ces formulations.

 Ces formulations pharmaceutiques actives concernent aussi bien la thérapeutique
10 humaine que vétérinaire.

 Les interférons sont des glycoprotéines appartenant à la famille des cytokines. Ce sont des médiateurs biologiques qui, en se fixant sur des récepteurs membranaires, déclenchent une réponse cellulaire pléiotropique. Il en résulte une activité antivirale, antiproliférative et immunomodulatrice.

15 Les interférons ont aussi été reconnus comme agents anti tumoral ou anticancéreux efficaces. Par interféron, on désigne ici toutes les formes d'interférons, telles que les interférons alpha, bêta ou gamma. L'IFN peut être produit par génie génétique .

 Les formulations pharmaceutiques à libération prolongée d'IFN, sont soumises à la nécessité de reproduire au mieux chez le patient une concentration plasmatique en IFN proche
20 de la valeur observée chez le sujet sain.

 Cet objectif se heurte à la faible durée de vie des IFN dans le plasma, ce qui oblige de manière très contraignante à les injecter de façon répétée. La concentration plasmatique en protéine thérapeutique présente alors un profil « en dents de scie » caractérisé par des pics élevés de concentration et des minima de concentration très bas. Les pics de concentration,
25 très supérieurs à la concentration basale chez le sujet sain, ont des effets nocifs très marqués du fait de la toxicité élevée des IFN. Par ailleurs, les minima de concentration sont inférieurs à la concentration nécessaire pour avoir un effet thérapeutique, ce qui entraîne une mauvaise couverture thérapeutique du patient et des effets secondaires graves à long terme.

 Aussi, pour reproduire chez le patient une concentration plasmatique en interféron
30 proche de la valeur idéale pour le traitement, il importe que la formulation pharmaceutique considérée permette de libérer la protéine thérapeutique sur une durée prolongée, de façon à limiter les variations de concentration plasmatique au cours du temps.

 Par ailleurs, cette formulation active doit de préférence satisfaire au cahier des charges suivant, déjà connu de l'homme de l'art :

35 1 - libération prolongée d'un ou plusieurs interférons actifs et non dénaturés (non

modifiés), de sorte que la concentration plasmatique est maintenue au niveau thérapeutique,

- 2 – forme liquide suffisamment fluide pour être aisément injectable et stérilisable par filtration sur des filtres dont la taille des pores est inférieure ou égale à 0,2 microns,
- 3 - forme liquide stable,
- 4 - biocompatibilité et biodégradabilité,
- 5 – non toxicité,
- 6 – non immunogénicité,
- 7 - excellente tolérance locale.

Pour tenter d'atteindre ces objectifs, plusieurs approches ont déjà été proposées dans l'art antérieur.

Dans la première approche, la protéine thérapeutique native est modifiée par greffage covalent d'une ou de plusieurs chaînes de polymère ou encore par greffage covalent d'une protéine telle que l'albumine sérique humaine (HSA). La protéine ainsi modifiée a une moindre affinité pour ses récepteurs et son temps de demi-vie dans la circulation générale augmente considérablement. L'amplitude de la variation de concentration entre les pics et les creux de concentration plasmatique en protéine est ainsi considérablement réduite. A titre d'illustration de cette première approche, il convient de noter que la société Shering Plough commercialise sous le nom VIRAFÉRON® PEG un interféron alpha 2b modifié chimiquement par greffage d'une chaîne de polyéthylène glycol (PEG) de masse 12kD. Cette modification chimique se traduit par une augmentation du temps de demi-vie chez le patient de 6,8 à 33 heures. Dans le même temps, la bioactivité de la protéine modifiée est fortement réduite. En outre, la modification irréversible de la protéine, qui n'est plus alors une protéine humaine, peut conduire à long terme à des problèmes de toxicité et d'immunogénicité.

Dans une deuxième approche, il a été proposé d'augmenter la durée d'action grâce à des formulations comportant au moins un polymère et un principe actif, liquides à température et atmosphère ambiantes, injectables et devenant plus visqueuses après injection, par exemple sous l'effet d'un changement de pH et/ou de température.

Ainsi dans ce registre, le brevet US-B-6 143 314 divulgue une solution organique polymère à libération contrôlée de PA, formant un implant solide après injection. Cette solution comprend:

- (A) 10 à 80 % en poids d'un polymère thermoplastique de base, biocompatible, biodégradable et insoluble dans l'eau ou les fluides physiologiques (par exemple PolyLactique et/ou PolyGlycolique) ;

- (B) un solvant organique, tel que la N-MéthylPyrrolidone se dispersant dans les fluides physiologiques ;
- (C) un principe actif (PA) ;
- (D) et enfin 1 à 50 % en poids d'un agent de libération contrôlée constitué par un copolymère bloc de type PolyLactiqueGlycolique / PolyÉthylèneGlycol.

Après injection, (B) se disperse ou se dissipe dans les fluides physiologiques. (A) forme un implant encapsulant (C) qui n'est pas lié de façon covalente ni à (A) ni à (D) et qui se libère alors lentement in vivo.

Le principal inconvénient de cette technique est d'utiliser un solvant organique (B), potentiellement dénaturant pour le PA (C) (e.g. protéines thérapeutiques) et toxique pour le patient. En outre, l'hydrolyse in vivo du polymère (A) génère un acide qui peut conduire à des problèmes de tolérance locale.

Les demandes PCT WO-A-99/18142 et WO -A-00/18821 concernent des solutions aqueuses de polymères qui contiennent un PA sous forme dissoute ou colloïdale, qui sont administrables à des animaux à sang chaud, notamment par injection et qui forment un dépôt de PA (e.g. insuline) gélifié in vivo, car la température physiologique est supérieure à leur température de gélification. Le gel ainsi formé libère le PA de façon prolongée. Ces polymères biodégradables particuliers sont des triblocs ABA ou BAB avec A = polylactique-coglycolique (PLAGA) ou polylactique (PLA) et B = PolyÉthylèneGlycol. Les températures de transformation liquide/gel de ces polymères triblocs sont par exemple de 36, 34, 30 et 26 °C. A l'instar des polymères (A) selon l'US-B-6 143 314, l'hydrolyse de ces polymères triblocs ABA ou BAB in vivo conduit à des acides qui peuvent ne pas être correctement tolérés localement.

La demande PCT WO-A-98/11874 décrit des formulations pharmaceutiques comprenant un principe actif lipophile, un polymère gélifiant (Gelrite® = gomme gellane désacétylée ou éthylhydroxycellulose) et un surfactant. L'interaction polymère/surfactant et éventuellement la seule présence d'électrolytes tels que des ions Ca^{++} en concentration physiologique s'agissant du polymère Gelrite®, conduit à la formation d'un gel constitué par un agrégat polymère/surfactant, auquel se lie de façon non covalente le principe actif lipophile. Cette formulation est destinée à une administration locale dans un organe cible (œil e.g.). L'association agrégat/principe actif qui se forme in situ permet la libération lente du principe actif dans l'organe cible.

Une troisième approche mise en œuvre pour tenter de prolonger la durée d'action d'une protéine tout en conservant sa bioactivité, fût d'utiliser une protéine thérapeutique non dénaturée et de l'incorporer dans des microsphères ou des implants à base de polymères

biocompatibles. Cette approche est notamment illustrée par le brevet US-B-6 500 448 et la demande US-A-2003/0133980 qui décrivent une composition à libération prolongée d'hormone de croissance humaine (hGH) dans laquelle, la protéine hormonale, préalablement stabilisée par complexation avec un métal, est ensuite dispersée dans une matrice polymère biocompatible. Le polymère biocompatible est par exemple un poly(lactide), un poly(glycolide) ou un copolymère poly(lactide-co-glycolide). La composition se présente par exemple sous la forme d'une suspension de microsphères dans une solution de carboxyméthylcellulose de sodium. Cette approche présente plusieurs inconvénients : tout d'abord, au cours du procédé de fabrication des microsphères, la protéine est mise au contact de solvants organiques potentiellement dénaturants. En outre, les microsphères sont d'une taille élevée (1 à 1000 microns), ce qui constitue une contrainte en termes d'injection et de stérilisation aisée sur filtres. Enfin, des problèmes de tolérance locale peuvent survenir lors de l'hydrolyse in situ du polymère.

Selon une quatrième approche, ont été développées des formes à libération prolongée de protéine thérapeutique (notamment d'interleukines) constituées par des suspensions liquides de nanoparticules chargées en protéines. Ces dernières ont permis l'administration de la protéine native dans une formulation liquide de faible viscosité.

Selon une première voie de libération prolongée, la suspension nanoparticulaire de libération prolongée est constituée par des suspensions de liposomes dans lesquelles la protéine thérapeutique native non modifiée est encapsulée. Après injection, la protéine est libérée progressivement des liposomes, ce qui prolonge le temps de présence de la protéine dans la circulation générale. Ainsi par exemple, Frossen et al, décrivent dans l'article *Cancer Res. 43 p 546, 1983* l'encapsulation d'agents anti-néoplastiques dans des liposomes afin d'en accroître l'efficacité thérapeutique. La libération de la drogue est cependant trop rapide pour obtenir une réelle libération prolongée. La société Liposome Company Inc, dans son brevet US-B-5 399 331 propose d'améliorer le temps de libération in vitro de l'interféron 2 en la greffant de façon covalente au liposome. On retombe alors dans les travers de la première approche "protéine modifiée" évoquée ci dessus.

Afin de pallier le manque de stabilité des liposomes, tout en gardant les avantages d'une formulation nanoparticulaire liquide et de basse viscosité, la société Flamel Technologies a proposé une deuxième voie de libération prolongée dans laquelle la protéine thérapeutique est associée à des nanoparticules d'un polymère hydrosoluble "modifié hydrophobe", c'est-à-dire modifié par greffage de groupements hydrophobes. Ce polymère est choisi, en particulier, parmi les polyaminoacides (polyglutamates ou polyaspartates) porteurs de greffons hydrophobes.

Un des intérêts notables de ces polymères modifiés hydrophobes est de s'auto assembler spontanément dans l'eau pour former des nanoparticules.

Un autre intérêt de ces systèmes est que les protéines ou les peptides thérapeutiques s'associent spontanément avec les nanoparticules de polymères modifiés hydrophobes, cette association est non covalente et s'effectue sans avoir recours à un tensioactif ni à un procédé de transformation potentiellement dénaturant. Il ne s'agit pas d'une encapsulation de la protéine dans une microsphère, comme divulgué dans le brevet US -B-6 500 448 et la demande US-A-2003/0133980. De façon totalement différente, ces nanoparticules de copolyaminoacides modifiés hydrophobes adsorbent spontanément les protéines en solution, sans les modifier chimiquement ni les dénaturer et sans leur faire subir des étapes de traitement agressives du type "mise en émulsion" et "évaporation de solvant". Les formulations peuvent être stockées sous forme liquide ou sous forme lyophilisée.

Après injection, par exemple par voie sous cutanée, ces suspensions de nanoparticules chargées en protéines libèrent progressivement la protéine non dénaturée et bioactive in vivo. De telles associations non covalentes principe actif (PA) protéinique / poly[Glu] ou poly[Asp] sont divulguées dans la demande de brevet WO -A-00/30618.

Cette demande décrit notamment des suspensions colloïdales de pH 7,4 comprenant des associations d'insuline humaine avec des nanoparticules de polyglutamate "modifié hydrophobe". Le tableau ci-dessous rend compte des polyaminoacides "modifiés hydrophobe" mis en œuvre et des taux d'association obtenus dans les exemples du WO-A-00/30618

EXEMPLE	POLYMERE	Taux d'association (%)
1	poly[(Glu-O-Na) _{0,63} bloc(Glu-O-méthyle) _{0,37}]	55
2	poly[Glu-O-Na) _{0,66} -bloc-(Glu-O-éthyle) _{0,34}]	26
3	poly(Glu-O-Na) _{0,65} -bloc-(Glu-O-hexadécyle) _{0,35}]	36
4	poly[(Glu-O-Na) _{0,88} -bloc-(Glu-O-dodécyle) _{0,12}]	> 90

Ces suspensions colloïdales titrent 1,4 mg/ml d'insuline et 10 mg/ml de polyaminoacide "modifié hydrophobe".

Il ressort de la figure 1 du WO-A-00/30618 que la durée de libération in vivo de l'insuline vectorisée par les suspensions susvisées, est de 12 h. Cette durée de libération

gagnerait à être augmentée.

Ainsi, même si cette demande PCT représente déjà un progrès considérable, son contenu technique peut encore être optimisé au regard du cahier des charges énoncé ci-dessus et surtout au regard de l'allongement de la durée de libération in vivo des interférons.

5 Les demandes de brevet français non publiées N^{os} 02 07008 du 07/06/2002, 02 09670 du 30/07/2002, 03 50190 du 28/05/2003 et 01 50641 du 03/10/2003, concernent de nouveaux polyaminoacides amphiphiles, hydrosolubles et comprenant des unités aspartique et/ou des unités glutamique, dans lesquels au moins une partie de ces unités sont porteuses de greffons hydrophobes. A l'instar des polyaminoacides modifiés hydrophobes divulgués dans la
10 demande WO-A-00/30618, ces nouvelles matières premières polymères forment spontanément en milieu liquide aqueux des suspensions colloïdales de nanoparticules qui peuvent être utilisées pour la libération prolongée de PA (insuline). Elles sont biocompatibles, biodégradables et les protéines, en particulier les protéines thérapeutiques s'adsorbent spontanément sur ces nanoparticules sans subir de modification chimique ou de dénaturation.

15 Ces demandes visent aussi de nouvelles compositions pharmaceutiques, cosmétiques, diététiques ou phytosanitaires à base de ces polyaminoacides.

Les polyaminoacides "modifiés hydrophobes" amphiphiles selon la demande de brevet français N° 02 07008 comprennent des unités aspartique et/ou des unités glutamique, porteuses de greffons hydrophobes comportant au moins un motif alpha-tocophérol, e.g. :
20 (polyglutamate ou polyaspartate greffé par l'alpha-tocophérol d'origine synthétique ou naturelle).

Cette demande non publiée divulgue spécifiquement une suspension colloïdale qui contient des nanoparticules formées par des associations polymère/protéine active et qui est obtenue en mélangeant 1 mg d'un polyglutamate greffé par l'alpha-tocophérol et 7 mg
25 d'insuline dans 1 ml d'eau, à pH 7,0.

Les polyaminoacides "modifiés hydrophobes" amphiphiles selon la demande de brevet français N° 02 09670 comprennent des unités aspartique et/ou des unités glutamique, porteuses de greffons hydrophobes comportant au moins un motif hydrophobe et reliés aux unités aspartique et/ou glutamiques par l'intermédiaire d'une rotule contenant deux fonctions
30 amides, et plus précisément via un "espaceur" de type lysine ou ornithine.

Cette demande non publiée divulgue spécifiquement une suspension colloïdale qui contient des nanoparticules formées par des associations polymère/protéine active et qui est obtenue en mélangeant 10 mg d'un polyglutamate greffé avec de l'acide palmitique via un "espaceur" lysine et 200 UI d'insuline (7,4 mg) dans 1 ml d'eau, à pH 7,4.

35 Les polyaminoacides "modifiés hydrophobes" amphiphiles selon la demande de brevet

français N° 03 50190 comprennent des unités aspartique et/ou des unités glutamique, dont certaines sont porteuses d'au moins un greffon relié à une unité aspartique ou glutamique, par l'intermédiaire d'un "espaceur" "acide aminé" à base de Leu, et/ou Ileu, et/ou Val, et/ou Phe, un groupement hydrophobe en C6 -C30 étant relié par une liaison ester à "l'espaceur".

5 Cette demande non publiée divulgue spécifiquement une suspension colloïdale qui contient des nanoparticules formées par des associations polymère/protéine active et qui est obtenue en mélangeant une solution aqueuse contenant 10 mg d'un polyglutamate greffé avec un greffon -Leu-OC8, -Val-OC12 ou -Val-cholestéryle et 200 UI d'insuline (7,4 mg), par millilitre d'eau, à pH 7,4.

10 La demande de brevet français N° 01 50641 divulgue des homopolyaminoacides linéaires, amphiphiles, anioniques, comprenant des unités aspartiques ou des unités glutamiques et dont les extrémités sont porteuses de groupements hydrophobes comportant de 8 à 30 atomes de carbone .

 En particulier, les homopolyaminoacides téléchéliques "modifiés hydrophobes" sont
15 par exemple un poly[GluONa] à extrémités PheOC18/C18 ou un poly[GluONa] à extrémités PheOC18/alpha-tocophérol. Cette demande non publiée décrit également une suspension colloïdale qui contient des nanoparticules formées par des associations polymère/protéine active et qui est obtenue en mélangeant 10 mg de l'un des polymères susvisés et 200 UI d'insuline (7,4 mg) par millilitre d'eau, à pH 7,4.

20 La durée de libération in vivo de l'insuline "vectorisée" par les suspensions selon ces demandes non publiées, gagnerait à être augmentée.

 En tout état de cause, tout cet art antérieur sur les suspensions colloïdales de nanoparticules de polyaminoacides modifiés hydrophobes, ne révèle pas de formulation permettant :

- 25 (I) d'accroître suffisamment la durée de libération de la protéine active après injection par voie parentérale, en particulier sous cutanée ;
 (II) et/ou de réduire le pic de concentration plasmatique de la protéine active après injection de la formulation la contenant.

 Dans ces conditions, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est donc de
30 proposer une formulation pharmaceutique liquide pour la libération prolongée d'IFN(s) actif(s), remédiant aux carences de l'art antérieur, et en particulier permettant après injection par voie parentérale (e.g. sous cutanée), d'obtenir une durée de libération in vivo prolongée pour des interférons non dénaturés.

 Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer une formulation
35 pharmaceutique liquide à libération prolongée d'interféron(s) in vivo, qui soit suffisamment

fluide pour être aisément injectable et stérilisable par filtration sur des filtres dont la taille des pores est inférieure ou égale à 0,2 microns.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer une formulation pharmaceutique liquide à libération prolongée d'interféron(s) in vivo, qui soit stable à la
5 conservation tant sur le plan physico-chimique que biologique.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer une formulation pharmaceutique liquide à libération prolongée d'interféron(s) in vivo, qui présente au moins l'une des propriétés suivantes: biocompatibilité, biodégradabilité, atoxicité, bonne tolérance locale.

10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer une formulation pharmaceutique pour la libération prolongée lente d'interféron(s) in vivo, cette formulation étant une suspension colloïdale aqueuse de basse viscosité comprenant des particules submicroniques de polymère PO auto-associées à au moins un interféron(s), le polymère PO étant un polymère biodégradable, hydrosoluble et porteur de groupements hydrophobes.

15 Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer une formulation pharmaceutique de libération prolongée lente d'interféron(s) in vivo, cette formulation étant une suspension colloïdale aqueuse de basse viscosité comprenant des particules submicroniques de polymère PO auto-associées à au moins un interféron, le polymère PO étant, par exemple, un polyaminoacide formé par des unités aspartiques et/ou des unités
20 glutamiques, au moins une partie de ces unités étant porteuses de greffons comportant au moins un groupement hydrophobe (GH), PO étant en outre biodégradable, hydrosoluble, et amphiphile.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer des produits dérivés et/ou des précurseurs de la formulation visée dans les objectifs sus énoncés.

25 Il est en particulier du mérite de la Demanderesse d'avoir mis au point des formulations pharmaceutiques liquides aqueuses de basse viscosité à température physiologique, qui, de façon surprenante, forment un dépôt gélifié in vivo après administration parentérale aisée chez l'homme ou les mammifères à sang chaud, la formation de ce dépôt n'étant pas déclenchée par un changement de pH ni de température lors de
30 l'injection parentérale, ni encore par la dispersion de solvant organique dans le milieu physiologique. Le dépôt gélifié ainsi formé augmente de façon significative la durée de libération in vivo de l'IFN.

D'où il s'ensuit que l'invention concerne une formulation pharmaceutique liquide pour la libération prolongée d'interféron(s), cette formulation comprenant une suspension
35 colloïdale, aqueuse, de basse viscosité, à base de particules submicroniques de polymère (PO)

biodégradable, hydrosoluble et porteur de groupements hydrophobes (GH), lesdites particules étant associées de façon non covalente avec au moins un interféron et éventuellement avec au moins un autre principe actif (PA), caractérisée :

- 5 ♦ en ce que le milieu dispersif de la suspension est essentiellement constitué par de l'eau,
- ♦ en ce qu'elle est apte à être injectée par voie parentérale et à former ensuite in vivo un dépôt gélifié, cette formation de dépôt gélifié :
 - 10 ○ étant, d'une part, au moins en partie provoquée par au moins une protéine physiologique présente in vivo,
 - et permettant, d'autre part, de prolonger et de contrôler la durée de libération du PA in vivo, au-delà de 24 h après l'administration,
- ♦ en ce qu'elle est liquide dans les conditions d'injection,
- ♦ et en ce qu'elle est également liquide à la température et/ou au pH physiologiques ,
15 et/ou en présence :
 - * d'électrolyte physiologique en concentration physiologique ,
 - * et/ou d'au moins un tensioactif.

Avantageusement, cette gélification in vivo ne résulte pas d'un changement de pH et/ou de température, ni d'une dispersion in vivo d'un ou plusieurs solvants organiques
20 éventuellement contenus dans la formulation injectée.

Sans vouloir être lié par la théorie, on peut penser que les protéines physiologiques présentes in vivo dans des concentrations physiologiques, permettent l'agrégation des nanoparticules de PO associées à au moins un interféron . Une telle gélification s'opère, par exemple, en une ou plusieurs heures, 24 h, 48 h ou 72 h, entre autres.

25 Le dépôt gélifié obtenu après injection parentérale de la formulation permet un e prolongation intéressante de la durée de libération de la protéine ainsi qu'une réduction du pic de concentration plasmatique d'interféron(s).

Conformément à une forme optimisée de l'invention, La concentration en [PO] est telle qu'elle forme un dépôt g élifié in vivo, après injection parentérale.

30 Selon un mode de définition , qui n'est plus basé sur un comportement in vivo comme ci-dessus indiqué, mais sur un comportement in vitro, l'invention concerne une formulation pharmaceutique liquide pour la libération prolongée de principe(s) actif(s) –PA-, cette formulation :

- étant liquide en atmosphère ambiante ,

- étant également liquide à la température et/ou au pH physiologiques et/ou en présence:
 - * d'électrolyte physiologique en concentration physiologique ,
 - * et/ou d'au moins un tensioactif ,
 - 5 ○ et comprenant une suspension colloïdale, aqueuse, de basse viscosité, à base de particules submicroniques de polymère PO biodégradable, hydrosoluble et porteur de groupements hydrophobes GH, lesdites particules étant associées de façon non covalente avec au moins un interféron (et éventuellement au moins un autre principe actif) et le milieu dispersif de la suspension étant essentiellement constitué
 - 10 par de l'eau,
- caractérisée en ce que sa concentration en [PO] est fixée à une valeur suffisamment élevée pour permettre la formation de dépôt gélifié in vitro, après injection parentérale, en présence d'au moins une protéine .

De préférence, la formulation pharmaceutique liquide selon l'invention est caractérisée en ce que sa concentration en [PO] est telle que :

- $[PO] \geq 0,9.C1$,
- de préférence $20.C1 \geq [PO] \geq C1$,
- et mieux encore $10.C1 \geq [PO] \geq C1$

avec C1 représentant la concentration de " *gélification induite* " des particules de PO telle que

20 mesurée dans un test GI.

Le dépôt gélifié obtenu après injection parentérale de la formulation permet une prolongation intéressante de la durée de libération de la protéine ainsi qu'une réduction du pic de concentration plasmatique d'interféron(s).

La durée de libération du PA est significativement augmentée par rapport à celle des

25 formulations de l'art antérieur, en particulier celles décrites dans la demande de brevet PCT publiée WO-A-00/30618 et les demandes de brevet français non publiées N^{os} 02 07008, 02 09670, 03 50190 et 01 50641.

La prolongation de la durée de libération in vivo induite par les formulations selon l'invention, est d'autant plus appréciable que les interférons libérés sont toujours pleinement

30 bioactifs et non dénaturés.

Les interférons au sens du présent exposé sont indifféremment des interférons non modifiés ou des interférons modifiés, par exemple par greffage d'un ou de plusieurs groupements polyoxyéthyléniques. Parmi les protéines de la famille des interférons, on peut citer: IFN alpha, IFN beta et IFN gamma.

35 Dans tout le présent exposé, les arrangements supramoléculaires polymère PO associé

ou non à au moins un interféron et, éventuellement à au moins un autre principe actif, seront indifféremment désignés par "particules submicroniques" ou "nanoparticules". Cela correspond à des particules de diamètre hydrodynamique moyen (mesuré selon un mode opératoire Md défini infra dans les exemples) e.g. compris entre 1 et 500 nm, de préférence entre 5 et 250 nm.

En outre, il est tout à fait important de noter que ces formulations sont liquides, c'est-à-dire présentent avantageusement une viscosité très faible, qui rend leur injection aisée. Elles ne gélifient qu'*in vivo*.

Suivant l'invention, les qualificatifs "liquide", "basse" ou "très faible viscosité" correspondent, avantageusement, à une viscosité dynamique à 20 °C inférieure ou égale à 5 Pa.s. La mesure de référence pour la viscosité peut être réalisée, par exemple, à 20 °C à l'aide d'un rhéomètre AR1000 (TA Instruments) équipé d'une géométrie cône -plan (4 cm, 2°). La viscosité η est mesurée pour un gradient de cisaillement de 10 s^{-1} .

Ainsi, la viscosité des formulations selon l'invention peut être, par exemple, comprise entre 1.10^{-3} et 5 Pa.s, de préférence entre 1.10^{-3} et 0,8 Pa.s et, plus préférentiellement encore, entre 1.10^{-3} et 0,5 Pa.s.

Cette faible viscosité rend les formulations de l'invention non seulement aisément injectables par voie parentérale, en particulier par voie intramusculaire ou sous-cutanée, entre autres, mais aussi stérilisables aisément et à moindre coût par filtration sur des filtres de stérilisation de 0,2 μm de taille de pores.

Cet état liquide ou cette faible viscosité des formulations de l'invention existe aussi bien à des températures d'injection correspondant à des températures ambiantes, par exemple comprises entre 4 et 30 °C, qu'à la température physiologique.

La formulation selon l'invention est, de préférence, une suspension colloïdale aqueuse de nanoparticules associées à un ou plusieurs interférons et éventuellement un ou plusieurs autres PA. Cela signifie que, conformément à l'invention, le milieu dispersif de cette suspension est essentiellement formé par de l'eau. En pratique, cette eau représente, par exemple, au moins 50 % en poids par rapport à la masse totale de la formulation.

Au sens de l'invention, le terme "protéine" désigne aussi bien une protéine qu'un peptide. Cette protéine ou ce peptide pouvant être modifié ou non, par exemple, par greffage d'un ou de plusieurs groupements polyoxyéthyléniques.

Par "protéines physiologiques", on entend, au sens de l'invention, les protéines et/ou les peptides endogènes des mammifères à sang chaud présents sur le site d'injection.

Par "température physiologique", on entend au sens de l'invention, la température physiologique des mammifères à sang chaud, à savoir par exemple environ 37 -42 °C.

Par "pH physiologique", on entend, au sens de l'invention, un pH par exemple compris entre 6 et 7,6.

Par "gel", on entend, au sens de l'invention, un état semi-solide dans lequel se transforme la formulation liquide selon l'invention, et ce spontanément par la seule présence de protéine(s) physiologique(s), sans intervention essentielle du pH physiologique et/ou de la température physiologique et/ou de la présence d'un électrolyte physiologique (Ca^{++} e.g.) et/ou de la dispersion (ou dissipation) in vivo d'un solvant organique éventuellement présent dans la formulation injectée.

Par "électrolyte physiologique", on entend, au sens de l'invention, tout élément électrolyte (par exemple des ions Ca^{++}) présent chez les mammifères à sang chaud.

Par "concentration physiologique", on entend, au sens de l'invention, toute concentration physiologique rencontrée chez les mammifères à sang chaud, pour le milieu physiologique considéré.

En outre, les formulations selon l'invention sont non toxiques, bien tolérées localement et stables.

Il est également du mérite des inventeurs d'avoir mis au point un test in vitro GI permettant de sélectionner une population des formulations préférées selon l'invention et de déterminer les concentrations idoines en PO dans les formulations.

Conformément à l'invention, le test GI de mesure de la concentration de gélification C1, est un test de référence permettant de définir la concentration critique C1, dénommée ci-après concentration de gélification induite C1, qui caractérise chaque formulation colloïdale selon l'invention.

Le test GI de détermination de la concentration C1 de gélification induite est le suivant :

Afin de déterminer la concentration C1, on prépare des formulations colloïdales de concentrations variables en polymère amphiphile selon l'invention et de concentration constante en protéine thérapeutique. A cette fin on met en solution dans de l'eau de -ionisée des quantités croissantes de poudre sèche du polymère. Les solutions sont maintenues à 25 °C sous agitation magnétique durant 16 heures avant d'être mélangées avec une solution concentrée en protéine thérapeutique. Le volume et la concentration de cette solution de protéine thérapeutique sont ajustés afin d'obtenir la concentration en protéine recherchée pour la formulation [par exemple 0,3 mg/ml d'interféron alpha 2b].

Les formulations colloïdales ainsi préparées sont mélangées à une solution aqueuse d'albumine de sérum bovin (BSA) concentrée à 30 mg/ml, puis centrifugées pendant 15 minutes à 3 000 t/min. Les mélanges sont laissés sous agitation douce pendant 24 h avant d'être récupérés pour être caractérisés.

Les mesures de viscoélasticité sont effectuées sur un rhéomètre TA instrument s
AR 1000, équipé d'une géométrie cône -plan (diamètre 4cm et angle 1,59). Une déformation
de 0,01 rad, située dans le domaine de viscoélasticité linéaire, est imposée de manière
sinusoïdale sur une gamme de fréquence comprise entre 0,1 et 300 rad/s. La température de
5 l'échantillon est maintenue constante à 20°C par le biais d'une cellule Peltier.

Les spectres en fréquence du module élastique G' et du module visqueux ou de perte,
 G'' , permettent de définir le temps de relaxation caractéristique T_r défini ici comme l'inverse
de la fréquence à laquelle le module élastique G' croise le module visqueux G'' , On trouvera
un exposé détaillé de ces questions dans l'ouvrage Ferry, *Viscoelastic Properties of Polymers*,
10 J.D.Ferry, J.Wiley, NY, 1980 et dans l'article de J. REGALADO *et al. Macromolecules* 1999,
32, 8580.

La mesure du temps de relaxation T_r en fonction de la concentration en polymère de la
formulation permet de définir la concentration C_1 à laquelle ce temps T_r excède 1 seconde.
Des exemples de valeurs de la concentration de gélification C_1 seront donnés dans
15 l'exemple 7 ci après.

De la même façon, on peut définir les concentrations $C_{0,1}$ et C_{10} pour lesquelles le
temps de relaxation dépasse respectivement 0,1 s et 10 s. Ces concentrations se classent dans
l'ordre croissant suivant : $C_{0,1} < C_1 < C_{10}$.

Suivant une variante de la formulation selon l'invention :

- 20 ➤ $[PO] \geq C_{0,1}$,
- de préférence $[PO] \geq C_1$,
- et plus préférentiellement encore $[PO] \geq C_{10}$.

Suivant une caractéristique additionnelle avantageuse : $[PO] \leq 20.C_1$

Au sens de l'invention et dans tout le présent exposé, les termes "association" ou
25 "associer" employés pour qualifier les relations entre un ou plusieurs principes actifs et les
polymères PO (par exemple les polyaminoacides), signifient en particulier que le ou les
principes actifs sont liés au(x) polymère (s) PO [par exemple le (ou les) polyaminoacide(s)]
par une liaison non covalente, par exemple par interaction électrostatique et/ou hydrophobe
et/ou liaison hydrogène et/ou gêne stérique.

30 Les polymères PO selon l'invention sont des polymères biodégradables, hydrosolubles
et porteurs de groupements hydrophobes GH. Les groupements hydrophobes peuvent être en
nombre réduit vis à vis du reste de la chaîne et peuvent se situer latéralement à la chaîne ou
intercalés dans la chaîne, et être répartis de façon aléatoire (copolymère statistique) ou répartis
sous forme de séquences ou de greffons (copolymères blocs ou copolymères séquencés).

Sans vouloir se limiter les polymères PO modifiés hydrophobes peuvent être choisis dans le groupe comprenant les copolyaminoacides amphiphiles, les polysaccharides -de préférence dans le sous-groupe comprenant les pullulanes et/ou les chitosans et/ou les mucopolysaccharides-, les gélatines ou leurs mélanges.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, PO est choisi parmi les copolyaminoacides amphiphiles.

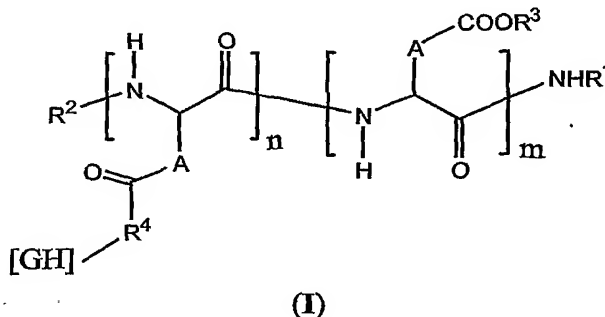
Au sens de l'invention et dans tout le présent exposé, le terme « *polyaminoacide* » couvre aussi bien les oligoaminoacides comprenant de 2 à 20 unités "acide aminé" que les polyaminoacides comprenant plus de 20 unités "acide aminé".

De préférence, les polyaminoacides selon la présente invention sont des oligomères ou des homopolymères comprenant des unités récurrentes acide glutamique ou aspartique ou des copolymères comprenant un mélange de ces deux types d'unités "acide aminé". Les unités considérées dans ces polymères sont des acides aminés ayant la configuration D ou L ou D/L et sont liées par leurs positions alpha ou gamma pour l'unité glutamate ou glutamique et alpha ou bêta pour l'unité aspartique ou aspartate.

Les unités "acide aminé" préférées de la chaîne polyaminoacide principale sont celles ayant la configuration L et une liaison de type alpha.

Suivant un mode encore plus préféré de réalisation de l'invention, le polymère PO est un polyaminoacide formé par des unités aspartiques et/ou des unités glutamiques, au moins une partie de ces unités étant porteuses de greffons comportant au moins un groupement hydrophobe GH. Ces polyaminoacides sont notamment du type de ceux décrits dans la demande de brevet PCT WO-A-00/30618.

Selon une première possibilité, le (ou les) PO de la formulation sont définis par la formule générale (I) suivante :



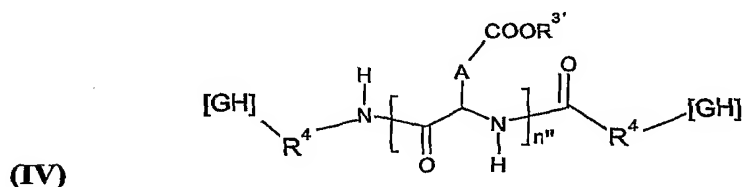
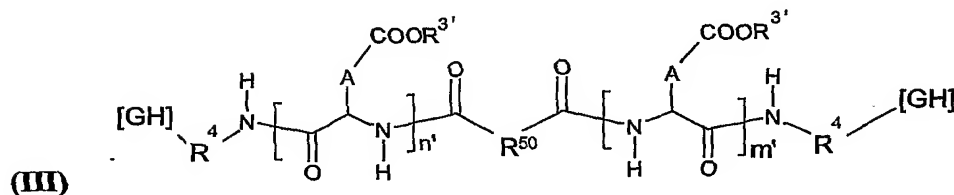
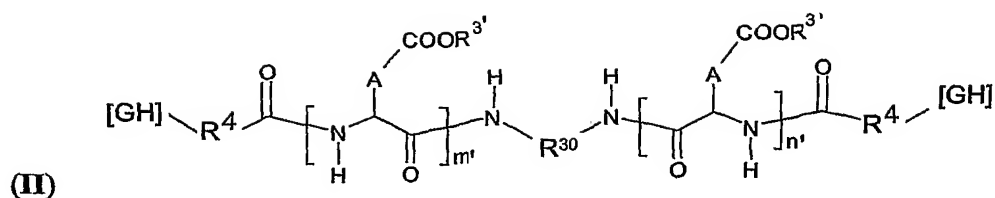
dans laquelle :

- R¹ représente un H, un alkyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, benzyle, une unité acide aminé terminale ou -R⁴-[GH] ;

- R^2 représente un H, un groupe acyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, un pyroglutamate ou $-R^4-[GH]$;
- R^3 est un H ou une entité cationique, de préférence sélectionnée dans le groupe comprenant :
 - les cations métalliques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant : le sodium, le potassium le calcium, le magnésium,
 - les cations organiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant :
 - les cations à base d'amine,
 - les cations à base d'oligoamine,
 - les cations à base de polyamine (la polyéthylèneimine étant particulièrement préférée),
 - les cations à base d'acide(s) aminé(s) avantageusement choisis dans la classe comprenant les cations à base de lysine ou d'arginine,
 - ou les polyaminoacides cationiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant la polylysine ou l'oligolysine ;
- R^4 représente une liaison directe ou un "espaceur" à base de 1 à 4 unités acide aminé ;
- A représente indépendamment un radical $-CH_2-$ (unité aspartique) ou $-CH_2-CH_2-$ (unité glutamique) ;
- $n/(n+m)$ est défini comme le taux de greffage molaire et sa valeur est suffisamment basse pour que PO mis en solution dans l'eau à pH 7 et à 25 °C, forme une suspension colloïdale de particules submicroniques de PO, de préférence $n/(n + m)$ est compris entre 1 à 25 % molaire et mieux encore entre 1 et 15 % molaire ;
- $n + m$ est défini comme le degré de polymérisation et varie de 10 à 1000, de préférence entre 50 et 300 ;
- GH représente un groupement hydrophobe.

Selon une deuxième possibilité, le (ou les) PO de la formulation répond à l'une des formules générales (II), (III) et (IV) suivantes :

16



5

dans lesquelles :

- GH représente un groupement hydrophobe ;
- R³⁰ est un groupement alkyle linéaire en C2 à C6 ;
- R^{3'} est un H ou une entité cationique, de préférence sélectionnée dans le groupe comprenant :
 - les cations métalliques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant : le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium,
 - les cations organiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant :
 - les cations à base d'amine,
 - les cations à base d'oligoamine,
 - les cations à base de polyamine (la polyéthylèneimine étant particulièrement préférée),
 - les cations à base d'acide(s) aminé(s) avantageusement choisis dans la classe comprenant les cations à base de lysine ou d'arginine,
 - ou les polyaminoacides cationiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant la polylysine ou l'oligolysine,
- R⁵⁰ est un groupement alkyle, dialcoxy ou diamine en C2 à C6;

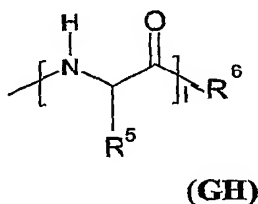
10

15

20

- R^4 représente une liaison directe ou un "espaceur" à base de 1 à 4 unités acide aminé ;
- A représente indépendamment un radical $-CH_2-$ (unité aspartique) ou $-CH_2-CH_2-$ (unité glutamique) ;
- 5 ▪ $n' + m'$ ou n'' est défini comme le degré de polymérisation et varie de 10 à 1000, de préférence entre 50 et 300.

Avantageusement, les n groupements GH du PO représentent chacun indépendamment les uns des autres un radical monovalent de formule suivante :



dans laquelle :

- R^5 représente un méthyle(alanine), isopropyle (valine), isobutyle (leucine), secbutyle (isoleucine), benzyle (phénylalanine) ;
- 15 - R^6 représente un radical hydrophobe comportant de 6 à 30 atomes de carbone;
- l varie de 0 à 6.

Selon une caractéristique remarquable de l'invention, tout ou partie des groupements hydrophobes R^6 des PO sont choisis de façon indépendante , dans le groupe de radicaux

20 comportant :

- un alcoxy linéaire ou ramifié comportant de 6 à 30 atomes de carbone et pouvant comporter au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S) et/ou au moins une insaturation,
- un alcoxy comportant 6 à 30 atomes de carbone et ayant un ou plusieurs carbocycles annelés et contenant éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S),
- 25 ▪ un alcoxyaryle ou un aryloxyalkyle de 7 à 30 atomes de carbone et pouvant comporter au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S).

30 En pratique et sans que cela ne soit limitatif, le radical hydrophobe R^6 du greffon du PO est issu d'un précurseur alcoolique choisi dans le groupe comprenant: l'octanol, le

dodécanol, le tétradécanol, l'hexadécanol, l'octadécanol, l'oleylalcool, le tocophérol ou le cholestérol.

Selon une première forme de réalisation de l'invention, les chaînes principales des polyaminoacides sont des homopolymères d'alpha -L-glutamate ou d'alpha-L-glutamique.

5 Selon une deuxième forme de réalisation de l'invention, les chaînes principales des polyaminoacides sont des homopolymères d'alpha -L-aspartate ou d'alpha-L-aspartique.

Selon une troisième forme de réalisation de l'invention, les chaînes principales des polyaminoacides sont des copolymères d'alpha -L-aspartate/alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-aspartique/alpha-L-glutamique.

10 Avantageusement, la distribution des unités aspartiques et/ou glutamiques de la chaîne polyaminoacide principale du PO est telle que le polymère ainsi constitué est soit aléatoire, soit de type bloc, soit de type multibloc.

De préférence, le PO mis en œuvre dans la formulation selon l'invention a une masse molaire qui se situe entre 2 000 et 100 000 g/mole, et de préférence entre 5 000 et 40 000 g/mole.

Suivant un premier mode préféré de réalisation de la formulation, le radical hydrophobe R⁶ du greffon du PO est issu d'un précurseur alcoolique formé par le tocophérol :

- ♦ $1 \% \leq [n / (n+m)] \times 100 \leq 10 \%$
- ♦ de préférence $3,5 \% \leq [n / (n+m)] \times 100 \leq 7,5 \%$
- ♦ $n + m$ varie de 100 à 400, de préférence entre 120 et 300.

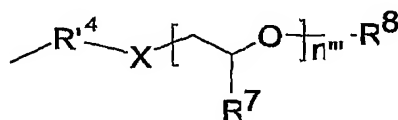
Suivant un deuxième mode préféré de réalisation de la formulation, le radical hydrophobe R⁶ du greffon du PO est issu d'un précurseur alcoolique formé par le cholestérol :

- ♦ $1 \% \leq [n / (n+m)] \times 100 \leq 10 \%$
- ♦ de préférence $3,5 \% \leq [n / (n+m)] \times 100 \leq 6,5 \%$
- ♦ $n + m$ varie de 100 à 400, de préférence entre 120 et 300.

Dans ces deux modes préférés de réalisation de la formulation de l'invention, il est avantageux que la concentration en polymère [PO] soit comprise entre 15 et 50 mg/ml

Selon une variante, le PO de la formulation selon l'invention est porteur d'au moins un greffon de type polyalkylène-glycol lié à une unité glutamate et/ou aspartate.

30 Avantageusement, ce greffon est de type polyalkylène-glycol est de formule (V) suivante.



(V)

dans laquelle :

- R^4 représente une liaison directe ou un "espaceur" à base de 1 à 4 unités acide aminé ;
- 5 - X est un hétéroatome choisi dans le groupe comportant l'oxygène, l'azote ou un soufre ;
- R^7 et R^8 représentent indépendamment un H, un alkyle linéaire en C1 à C4 ;
- n''' varie de 10 à 1000, de préférence de 50 à 300.

En pratique, le polyalkylène glycol est par exemple un polyéthylène glycol.

- 10 Il est souhaitable, conformément à l'invention, que le pourcentage molaire de greffage du polyalkylène glycol varie de 1 à 30 %.

Les polyaminoacides PO sont en outre extrêmement intéressants, du fait qu'à un taux de greffage ajustable, ils se dispersent dans l'eau à pH 7,4 (par exemple avec un tampon phosphate) pour donner des suspensions colloïdales.

- 15 De plus, les principes actifs que sont les interférons ou d'autres PA choisis parmi les protéines, les peptides ou les petites molécules, peuvent s'associer spontanément à des nanoparticules comprenant ces polyaminoacides PO.

- 20 Il convient de comprendre que les PO à base de polyaminoacides contiennent des fonctions carboxyliques qui sont, soit neutres (forme COOH), soit ionisées (anion COO^-), selon le pH et la composition. Pour cette raison, la solubilité dans une phase aqueuse est directement fonction du taux de COOH libres des PO (non greffé par le motif hydrophobe) et du pH. En solution aqueuse, le contre-cation peut être un cation métallique tel que le sodium, le calcium ou le magnésium, ou un cation organique tel que la triéthanolamine, la tris(hydroxyméthyl)-aminométhane ou une polyamine tel que la polyéthylèneimine.

- 25 Les PO de type polyaminoacides susceptibles d'être utilisés dans la formulation de l'invention sont, par exemple, obtenus par des méthodes connues de l'homme de l'art. Les polyaminoacides statistiques peuvent être obtenus par greffage du greffon hydrophobe, préalablement fonctionnalisé par "l'espaceur", directement sur le polymère par une réaction classique de couplage. Les PO polyaminoacides blocs ou multiblocs peuvent être obtenus par
- 30 polymérisation séquentielle des anhydrides de N-carboxy-aminoacides (NCA) correspondants.

On prépare par exemple un polyaminoacide, homopolyglutamate, homopolyaspartate ou un copolymère glutamate/aspartate, bloc, multibloc ou aléatoire selon des méthodes classiques.

Pour l'obtention de polyaminoacide de type alpha, la technique la plus courante est basée sur la polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-aminoacides (NCA), décrite, par exemple, dans l'article "*Biopolymers*, 1976, 15, 1869 et dans l'ouvrage de H.R. Kricheldorf "*alpha-Aminoacid-N-carboxy Anhydride and related Heterocycles*" Springer Verlag (1987).

5 Les dérivés d'NCA sont de préférence des dérivés NCA -O-Me, NCA-O-Et ou NCA-O-Bz (Me = Méthyl, Et = Ethyle et Bz = Benzyle). Les polymères sont ensuite hydrolysés dans des conditions appropriées pour obtenir le polymère sous sa forme acide. Ces méthodes sont inspirées de la description donnée dans le brevet FR -A-2 801 226 de la demanderesse. Un certain nombre de polymères utilisables selon l'invention, par exemple, de type poly(alpha -L-

10 aspartique), poly(alpha-L-glutamique), poly(alpha-D-glutamique) et poly(gamma-L-glutamique) de masses variables sont disponibles commercialement. Le polyaspartique de type alpha-bêta est obtenu par condensation de l'acide aspartique (pour obtenir un polysuccinimide) suivie d'une hydrolyse basique (cf. Tomida et al. Polymer 1997, 38, 4733-36).

15 Le couplage du greffon avec une fonction acide du polymère est réalisé aisément par réaction du polyaminoacide en présence d'un carbodiimide comme agent de couplage et optionnellement, un catalyseur tel que le 4-diméthylaminopyridine et dans un solvant approprié tel que la diméthylformamide (DMF), la N-méthyl pyrrolidone (NMP) ou la diméthylsulfoxyde (DMSO). Le carbodiimide est par exemple, le dicyclohexylcarbo-diimide

20 ou le diisopropylcarbodiimide. Le taux de greffage est contrôlé chimiquement par la stœchiométrie des constituants et réactifs ou le temps de réaction. Les greffons hydrophobes fonctionnalisés par un "espaceur" sont obtenus par couplage peptidique classique ou par condensation directe par catalyse acide. Ces techniques sont bien connues de l'homme de l'art.

25 Pour la synthèse de copolymère bloc ou multibloc, on utilise des dérivés NCA préalablement synthétisés avec le greffon hydrophobe. Par exemple, le dérivé NCA -hydrophobe est copolymérisé avec le NCA-O-Benzyl puis on enlève par hydrolyse sélectivement les groupements benzyliques.

La synthèse de polyaminoacides PO conduit préférablement à des suspensions

30 aqueuses de nanoparticules de PO.

De telles suspensions peuvent être transformées en poudres de nanoparticules de PO par séchage, de manière appropriée et connue de l'homme de l'art, comme par exemple : chauffage (étuve....), mise sous vide, utilisation de dessiccants, lyophilisation, atomisation.

Ces nanoparticules de PO, en suspension ou à l'état pulvérulent, forment une matière

35 première pour la préparation des formulations selon l'invention.

A ce propos, il peut être précisé que les formulations selon l'invention résultent de l'association non covalente de nanoparticules à base d'au moins un PO et d'au moins un PA, dans un milieu liquide aqueux.

Pour la préparation, le PO et/ou l'interféron(s) (et/ou l'éventuel PA supplémentaire) peut être sous forme solide (de préférence poudre) et/ou sous forme liquide (de préférence suspension aqueuse colloïdale).

L'association interféron(s)/PO signifie au sens du présent exposé que le (ou les) interféron(s) est (sont) associé(s) au(x) polymère(s) PO [e.g. un ou plusieurs polyaminoacide(s)] par une ou plusieurs liaisons autre(s) qu'une (ou que des) liaison(s) chimique(s) covalente(s).

Les techniques d'association d'un ou de plusieurs interleukines aux PO selon l'invention, sont décrites notamment dans la demande de brevet WO -A-00/30618. Elles consistent à incorporer au moins un interféron (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels) dans le milieu liquide contenant des nanoparticules de PO, de manière à obtenir une suspension colloïdale de nanoparticules chargées en ou associées avec un ou plusieurs interférons (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels).

L'invention a donc également pour objet un procédé de préparation de la formulation susvisée.

Selon un premier mode préféré de mise en oeuvre, ce procédé est caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement :

- ♦ à mettre en oeuvre une suspension colloïdale de nanoparticules d'au moins un PO,
- ♦ à mélanger cette suspension colloïdale de nanoparticules de PO avec au moins un interféron (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels), de préférence en solution aqueuse,
- ♦ à ajouter éventuellement au moins un excipient,
- ♦ au besoin à ajuster le pH et/ou l'osmolarité et,
- ♦ éventuellement à filtrer la suspension ainsi obtenue.

Avantageusement, l'interféron (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels) est sous forme de suspension ou de solution aqueuse pour le mélange avec la suspension colloïdale de nanoparticules de PO.

Selon un second mode de réalisation, ce procédé est caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement :

- ♦ à mettre en oeuvre une poudre d'au moins un polymère PO,

- ♦ à mélanger cette poudre avec une suspension ou solution aqueuse d'au moins un interféron (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels), de préférence en solution aqueuse,
- ♦ à ajouter éventuellement au moins un excipient,
- 5 ♦ au besoin à ajuster le pH et/ou l'osmolarité et,
- ♦ éventuellement à filtrer la suspension ainsi obtenue.

Les formulations ainsi obtenues peuvent également être mises en sous forme de gels, de poudre ou de film par les méthodes classiques connues de l'homme de l'art, telles que la concentration par diafiltration ou évaporation, le couchage, l'atomisation ou la lyophilisation, 10 entre autres. Ces méthodes peuvent être éventuellement combinées.

D'où il s'ensuit un troisième mode de mise en œuvre du procédé de préparation des formulations liquides selon l'invention, ce troisième mode consistant essentiellement :

- ♦ à mettre en œuvre une poudre issue du séchage de la formulation liquide selon l'invention telle que définie ci-dessus,
- 15 ♦ à mélanger cette poudre avec un milieu liquide aqueux, de préférence sous agitation,
- ♦ à ajouter éventuellement au moins un excipient,
- ♦ au besoin à ajuster le pH et/ou l'osmolarité et,
- ♦ éventuellement à filtrer la suspension ainsi obtenue .

20 Les excipients susceptibles d'être rajoutés sont par exemple des antimicrobiens, des tampons, des antioxydants, des agents permettant d'ajuster l'isotonicité qui sont connus de l'homme de l'art. On pourra par exemple se référer à l'ouvrage : *Injectable Drug Development*, P.K. Gupta et al., Interpharm Press, Denver, Colorado 1999.

25 La filtration éventuelle de la formulation liquide sur des filtres de porosité égale, par exemple, à 0,2 μm , permet de la stériliser. Elle peut être ainsi directement injectée à un patient.

Tous ces exemples de préparation de formulations liquides selon l'invention sont avantageusement réalisés en atmosphère et à température ambiantes (25 °C e.g.).

Suivant une disposition intéressante de la formulation selon l'invention, sa fraction 30 massique en interleukine(s) non associée(s) aux particules submicroniques [interleukine(s) non associée(s)] en % en poids est telle que :

- [interféron(s) non associé(s)] ≤ 1
- de préférence [interféron(s) non associé(s)] $\leq 0,5$.

35 Conformément à l'invention, l'interféron préféré est l'interféron alpha.

Selon un autre de ses aspects, l'invention englobe tout produit dérivé obtenu à partir de la formulation liquide selon l'invention telle que définie supra et comprenant des particules submicroniques, formées par des associations non covalentes PO /interféron telles que définies
5 ci-dessus.

En pratique, ces produits dérivés peuvent notamment être constitués par des poudres, des gels, des implants ou des films, entre autres.

En outre, l'invention vise tout précurseur de la formulation liquide injectable telle que définie supra.

10 S'agissant toujours de ces produits dérivés, il doit être souligné que l'invention concerne également un procédé de préparation d'une poudre dérivée de la formulation telle que définie supra, ce procédé étant caractérisé en ce que ladite poudre est obtenue par séchage de la formulation telle que définie ci-dessus.

La formulation selon l'invention est de préférence pharmaceutique, sans exclure les
15 formulations cosmétiques, diététiques ou phytosanitaires comprenant au moins un PO tel que défini ci-dessus et au moins un interféron et éventuellement au moins un autre principe actif.

Selon l'invention, l'éventuel principe actif supplémentaire autre qu'un interféron, peut être une protéine, une glycoprotéine, une protéine liée à une ou plusieurs chaînes polyalkylèneglycol [de préférence PolyÉthylèneGlycol (PEG) : "protéine-PEGylée"], un
20 polysaccharide, un liposaccharide, un oligonucléotide, un polynucléotide ou un peptide.

Ce principe actif supplémentaire peut être sélectionné parmi les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les cytokines, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ou leurs mélanges .

25 Selon une variante, ce principe actif supplémentaire est une "petite" molécule organique hydrophobe, hydrophile ou amphiphile, par exemple les peptides tels que la leuprolide ou la cyclosporine ou les petites molécules telles que celles appartenant à la famille des anthracyclines, des taxoïdes ou des camp tothécines et leurs mélanges .

Parmi les qualités primordiales de la formulation selon l'invention, figurent son
30 caractère injectable et sa capacité à former un dépôt sur le site d'injection, in vivo, par gélification ou encore par agrégation des nanoparticules, en présence de protéines physiologiques ou analogues.

La formulation selon l'invention peut notamment être injectée par voie parentérale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou dans une
35 tumeur.

La formulation selon l'invention peut aussi être administrée par voie orale, nasale, vaginale, oculaire ou buccale.

Avantageusement, la formulation est destinée à la préparation de médicaments, en particulier pour administration parentérale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, 5 intrapéritonéale, intracérébrale ou dans une tumeur, voire par voie orale, nasale, vaginale ou oculaire.

Bien que la formulation selon l'invention soit de préférence pharmaceutique, cela n'exclut pas pour autant les formulations cosmétiques, diététiques ou phytosanitaires comprenant au moins un PO tel que défini ci-dessus et au moins un principe actif 10 correspondant.

Selon encore un autre de ses aspects, l'invention vise un procédé de préparation de médicaments, en particulier pour administration parentérale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou dans une tumeur, voire par voie orale, nasale, vaginale ou oculaire, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mettre en œuvre 15 au moins une formulation sus-définie et/ou tout produit dérivé et/ou tout précurseur de ladite formulation.

L'invention concerne également une méthode de traitement thérapeutique consistant essentiellement à administrer la formulation telle que décrite dans le présent exposé, par voie parentérale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou 20 dans une tumeur, voire par voie orale, nasale, vaginale ou oculaire.

Suivant une variante particulière de l'invention, cette méthode de traitement thérapeutique consiste essentiellement à administrer la formulation telle que décrite supra par injection parentérale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou dans une tumeur, de préférence de manière à ce qu'elle forme un dépôt 25 gélifié/réticulé sur le site d'injection.

L'invention sera mieux comprise et ses avantages et variantes de mise en œuvre ressortiront bien des exemples qui suivent et qui décrivent la synthèse des PO formés par des polyaminoacides greffés par un groupement hydrophobe, leur transformation en système de libération prolongée d'un interféron, à savoir en formulation selon l'invention (suspension 30 colloïdale aqueuse stable) et la démonstration de la capacité d'un tel système non seulement de s'associer à un interféron, mais surtout à gélifier/réticuler pour libérer de manière très prolongée in vivo les interférons.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1. Courbes des Concentrations plasmatiques d' IFN (picogramme/mL) relevées chez le chien après injection sous cutanée

- de la formulation d' IFN (A) selon l'invention (exemples 9 & 10) :
(courbe —■—■—
 - et de la formulation d' IFN (D) témoin hors de l'invention (exemple 10) :
(courbe —▲—▲—,
- en fonction du temps T en heures et à une dose d' IFN de 60µg/kg.

EXEMPLES

Exemple 1 : Polymère amphiphile P1

Synthèse d'un polyglutamate greffé par l'alpha -tocophérol d'origine synthétique

- On solubilise 5,5 g d'un alpha-L-polyglutamate (de masse équivalente à environ 10 000 Da) par rapport à un standard en polyoxyéthylène et obtenu par polymérisation de NCAGluOMe suivie d'une hydrolyse comme décrits dans la demande de brevet FR -A-2 801 226) dans 92 ml de diméthylformamide (DMF) en chauffant à 40°C pendant 2 heures. Une fois le polymère solubilisé, on laisse revenir la température à 25 °C et on ajoute successivement 1,49 g de D,L -
- alpha-tocophérol (> 98 % obtenu de Fluka®) préalablement solubilisé dans 6 ml de DMF, 0,09 g de 4-diméthylaminopyridine préalablement solubilisé dans 6 ml de DMF et 0,57 g de diisopropylcarbodiimide préalablement solubilisé dans 6 ml de DMF. Après 8 heures à 25 °C sous agitation, le milieu réactionnel est versé dans 800 ml d'eau contenant 15 % de chlorure de sodium et d'acide chlorhydrique (pH 2). Le polymère précipité est ensuite récupéré par
- filtration, lavé par de l'acide chlorhydrique 0,1 N puis par de l'eau. Le polymère est ensuite resolubilisé dans 75 ml de DMF puis reprécipité dans de l'eau contenant comme précédemment du sel et de l'acide à pH 2. Après deux lavages à l'eau, on lave plusieurs fois par de l'éther diisopropylique. Le polymère est ensuite séché à l'étuve sous vide à 40 °C. On obtient un rendement de l'ordre de 85 %.

Exemple 2 : Polymères amphiphiles P2, P3, P4, P5 et P6

Ces polymères sont obtenus de la même façon que pour l'obtention du polymère P1. Le tableau 1 ci-dessous résume les caractéristiques de ces polymères. Celles du polymère P1 sont données à titre de comparaison.

TABLEAU 1

Polymère	Mn ¹ g/mol du polyglutamate	Groupement hydrophobe	% de greffage (RMN) ²	Mn ¹ g/mol du polymère
P1	10 000	alpha-tocophérol ³	7	13 900
P2	10 000	alpha-tocophérol ³	4	14 400
P3	16 900	alpha-tocophérol ³	4	15 200
P4	10 000	Cholestérol	5	11 500
P5	16 900	Cholestérol	5	12 900
P6	10 000	n-Dodécanol	15	11 500

¹ En équivalent polyoxyéthylène.

² Taux de greffage molaire estimé par la RMN du proton.

5 ³ d'origine synthétique

Exemple 3 : Préparation de 30 ml d'une formulation d'interféron alpha 2b (IFN) à base du polymère P6.

10 (a) Préparation d'une solution colloïdale de polymère amphiphile :

On introduit dans un flacon 1,5 g de poudre lyophilisée du polyaminoacide amphiphile P6 de l'exemple 2 ci-dessus. Cette poudre est dissoute dans 30 ml d'eau stérile pour injection. La solution de polymère est maintenue 16 heures à 35°C sous agitation magnétique. L'osmolarité de la solution est ajustée à 275 ± 20 mOsmol à l'aide d'un osmomètre Fiske Mark 3, en

15 introduisant la quantité nécessaire d'une solution aqueuse de NaCl 5,13M (30 % p/p). Le pH est ajusté si nécessaire à $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$ par ajout d'une solution de NaOH 1N. La concentration en polymère est ajustée à 45 mg/ml par ajout d'une solution aqueuse stérile de NaCl 0,15M. La solution de polymère est ensuite filtrée sur un filtre de taille de pore comprise entre 0,8 et 0,2 microns, puis stockée à 4 °C.

20

(b) Association de la protéine au polymère :

Dans un flacon en verre, on mélange ensuite 26,65 ml de la solution colloïdale de polymère P6 précédente et 1,85 ml de solution d'IFN (PC GEN ; solution concentrée à 2,42 mg/ml). L'osmolarité et le pH sont réajustés si nécessaire à 300 ± 20 mOsmol et $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$ par

25 ajout de soude 0,1N et chlorure de sodium 0,9 % stérile. La solution chargée en protéine est mise en maturation pendant 5 h à 25°C à l'étuve, puis est ensuite filtrée sur 0,8 -0,2 microns.

On obtient ainsi 30 ml d'une formulation prête à être injectée contenant 0,15 mg/ml d'IFN et 40 mg/ml de polymère P6.

5 Exemple 4: Préparation d'une formulation d'interféron (IFN) longue action selon la présente invention, à base de l'un des polym ères P1 à P5.

La préparation s'effectue comme dans l'exemple 3 en préparant dans un premier temps une solution colloïdale de polymère à 1,25 fois la concentration finale recherchée, puis en mélangeant cette solution avec une solution d'interféron concentrée à 2,42 mg/ml. Le volume
 10 de la solution de protéine est déterminé par le choix du rapport de la concentration en polymère à la concentration en protéine visée. Comme dans l'exemple 3, les ajustements de concentrations et de pH sont réalisés par ajout de solution de NaCl et de soude.

15 Exemple 5 : Mesure du diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules de différents polymères PO selon l'invention .

Le diamètre hydrodynamique moyen des particules de polymère PO selon l'invention est mesuré selon le Mode opératoire Md défini ci-après .

Les solutions de PO sont préparées à des concentrations de 1 ou 2 mg/ml en milieu NaCl
 20 0,15M et laissées sous agitation pendant 24 h. Ces solutions sont ensuite filtrées sur 0,8-0,2 µm, avant de les analyser en diffusion dynamique de la lumière grâce à un appareil de type Brookhaven, fonctionnant avec un faisceau laser de longueur d'onde 488 nm et polarisé verticalement. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules de polymère PO est calculé à partir de la fonction d'autocorrélation du champ électrique par la méthode des cumulants,
 25 comme décrit dans l'ouvrage « Surfactant Science Series » volume 22, Surfactant Solutions, Ed. R. Zana, chap. 3, M. Dekker, 1984.

On obtient les résultats suivants pour les polymères PO P2 P3 P4 et P6 de l'exemple 2 :

TABLEAU 2

30

Polymère	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)
P2	60
P3	90
P4	30
P6	15

Exemple 6 : Association spontanée d'une protéine aux nanoparticules de polymère PO

5

Une solution de tampon phosphate à 25 mM est préparée à partir de poudre de NaH_2PO_4 (Sigma ref S-0751) et ajustée avec de la soude 1N (SDS ref 3470015) à pH = 7.2.

Une suspension colloïdale de nanoparticules de polymère P1 est préparée par dissolution pendant une nuit du polymère lyophilisé à 5 mg/ml dans la solution de tampon phosphate précédente.

10

Une solution mère de BSA (Sigma A -2934) est préparée par dissolution pendant deux heures de protéine à 10 mg/ml dans le même tampon.

Les solutions mères ainsi que le tampon sont filtrées sur 0,22 μm

Des mélanges sont réalisés par ajout de volumes prédéterminés des deux solutions mères et dilution dans le tampon phosphate de façon à avoir au final une gamme d'échantillons ayant une concentration constante en polymère (0,1 mg/ml) et des concentrations croissantes de protéines (0 à 1,8 mg/ml).

15

Les échantillons sont laissés 5 heures à associer à 25 °C puis ils sont analysés par électrophorèse capillaire dans une méthode dite frontale où il est possible de visualiser séparément la protéine et le complexe protéine – polymère. Pour plus de détails sur cette technique, on consultera l'article suivant : Gao JY, Dublin PL, Muhoberac BB, Anal. Chem. 1997, 69, 2945. Les analyses sont réalisées sur un appareil Agilent G16000A muni d'un capillaire à bulle en silice fondue (type G1600-62-232). La hauteur du premier plateau correspondant à la protéine libre permet de déterminer la concentration en BSA non associée.

20

L'expérience montre que pour des quantités de protéines inférieures à 0,1 g de protéine par g de polymère, la protéine est associée aux nanoparticules de polymère.

25

Exemple 7 : Détermination de la concentration de gélification C1 pour les polymères PO P1 à P4 et P6.

30

Le test GI est appliqué à des formulations d'IFN associés aux polymères P1 à P6 des exemples 1 et 2. Les concentrations en protéines de ces formulations sont reportées dans le tableau ci dessous. La mesure du temps de relaxation des formulations en présence de BSA (concentration 30 mg/ml) s'effectue selon le mode opératoire du test GI. La concentration

critique C1, pour laquelle le temps de relaxation excède 1s est reportée sur le tableau 3 pour l'IFN.

TABLEAU 3 :

5 Concentration de gélification induite pour des formulations d'IFN

Polymère	P1	P2	P3	P4	P6
Concentration en IFN (mg/ml)	0,3	0,15	0,15	0,15	0,3
Concentration C1 (mg/ml)	17	>30	16	17	>50

10 **Exemple 8 : Pharmacocinétique de l'IFN chez le chien après injection sous cutanée d'une formulation d'IFN appartenant à la sélection selon l'invention.**

Une formulation (A) d'IFN (concentration 0,3 mg/ml) et de polymère amphiphile P1 à la concentration de 30 mg/ml est préparée selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 4.

15 Cette formulation est injectée par voie sous cutanée à des chiens Beagles ($n = 3$), à la dose de 60 µg/kg). Des prélèvements de sérum sont effectués aux temps 1, 5, 11, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 et 240 heures. La concentration plasmatique en IFN est mesurée sur ces prélèvements par dosage ELISA (kit immunotech IM 3193).

20 On obtient ainsi un profil de concentration plasmatique moyen tel que représenté sur la figure 1 qui met clairement en évidence la libération prolongée de la protéine dans le sérum par rapport à une formulation témoin (D) hors invention d'IFN (concentration 0,3 mg/ml) et de polymère amphiphile P6 à la concentration de 40 mg/ml (cf. tableau 5, exemple 9). Sur un plan quantitatif, la prolongation de la libération de l'IFN par les formulations selon l'invention est estimée par la mesure :

- 25 (a) du temps Tmax, médiane du temps pour lequel la concentration plasmatique est maximale,
- (b) du temps T50, moyenne du temps au bout duquel l'aire sous la courbe de concentration plasmatique atteint 50% de sa valeur maximale mesurée.

Dans le cas de cette formulation, les temps Tmax et T50 prennent les valeurs :

T_{max} = 48 heures,
 T₅₀ = 54,2 heures.

5 **Exemple 9 : Pharmacocinétique de l'IFN chez le chien après injection sous cutanée de diverses formulations d'IFN à base de polyaminoacides amphiphiles.**

Les formulations suivantes sont préparées selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 4.

10

TABLEAU 4

Formulation	Polymère	Concentration en polymère (mg/ml)	Concentration en IFN (mg/ml)	Temps de relaxation Tr(s)
A	P1	30	0,3	> 10
B	P1	10,5	0,15	< 0,3
C	P2	15	0,15	< 0,03
D	P6	40	0,3	0,4

- La formulation A a une concentration en polymère supérieure à la concentration de gélification C₁ mesurée dans l'exemple 6. En d'autres termes, le temps de relaxation, mesuré dans le test GI est supérieur à 1 seconde. Cette formulation A appartient donc à la sélection selon l'invention. En revanche, les formulations B, C et D ont des concentrations inférieures à leurs concentrations de gélification et n'appartiennent pas à la sélection selon l'invention.
- Ces formulations sont injectées à la dose de 60 µg/ kg à des chiens Beagles. Des prélèvements de plasma sont effectués aux temps 1, 5, 11, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 et 240 heures.
- La concentration plasmatique en IFN est mesurée comme dans l'exemple précédent.
- Les temps T_{max} et T₅₀ pour les formulations A, B, C et D sont reportés dans le tableau 5 ci-dessous.

TABLEAU 5

Référence formulation	Tmax (h)	T50 (h)
A	48	54,2
B	5	16,7
C	11	19,3
D	5	17,3

Ainsi, la formulation A, qui appartient à la sélection selon l'invention, présente une durée de libération considérablement accrue par rapport aux formulations B, C, et D qui n'appartiennent pas à la sélection selon l'invention.

Exemple 10 : Observation de la gélification in vivo des formulations selon l'invention après injection sous-cutanée.

Le comportement sous cutané des formulations selon l'invention a été étudié chez le porc domestique. On a procédé à des injections sous la peau du ventre, à 4 mm de profondeur, de six porcs domestiques, avec 0,3 ml des formulations suivantes :

Formulation A : solution aqueuse isotonique à pH 7,3 du polymère P6 de l'exemple 2 concentré à 45 mg/ml.

Formulation B : solution aqueuse isotonique à pH 7,3 du polymère P1 de l'exemple 1 concentré à 20 mg/ml.

Les sites injectés ont été prélevés 72 heures après administration. L'examen histologique révèle la présence d'un dépôt gélifié de polymère pour la formulation B. Il se présente sous forme de plages uniformément colorées. Ce phénomène n'est en revanche pas observé pour la formulation A pour laquelle le polymère est infiltré entre les fibres de collagène.

On peut souligner que la matrice de polymère B est parfaitement biodégradable car le tissu est complètement revenu à son état normal après 21 jours.

REVENDICATIONS

- 1 - Formulation pharmaceutique liquide pour la libération prolongée d'interféron(s), cette formulation comprenant une suspension colloïdale, aqueuse, de basse viscosité, à base de particules submicroniques de polymère (PO) biodégradable, hydrosoluble et porteur de groupements hydrophobes (GH), lesdites particules étant associées de façon non covalente avec au moins une interleukine et éventuellement avec au moins un autre principe actif (PA),
caractérisée :
- 10 ♦ en ce que le milieu dispersif de la suspension est essentiellement constitué par de l'eau,
 - ♦ en ce qu'elle est apte à être injectée par voie parentérale et à former ensuite in vivo un dépôt gélifié, cette formation de dépôt gélifié :
 - 15 ○ étant, d'une part, au moins en partie provoquée par au moins une protéine physiologique présente in vivo,
 - et permettant, d'autre part, de prolonger et de contrôler la durée de libération du PA in vivo, au-delà de 24 h après l'administration,
 - ♦ en ce qu'elle est liquide dans les conditions d'injection ,
 - ♦ et en ce qu'elle est également liquide à la température et/ou au pH physiologiques ,
20 et/ou en présence :
 - * d'électrolyte physiologique en concentration physiologique ,
 - * et/ou d'au moins un tensioactif.
- 2 - Formulation selon la revendication 1, caractérisée en ce que sa concentration en [PO] est fixée à une valeur suffisamment élevée pour permettre la formation de dépôt gélifié in vivo, après injection parentérale, en présence d'au moins une protéine physiologique.
- 3 - Formulation pharmaceutique liquide pour la libération prolongée d'interféron(s) et, éventuellement d'autre(s) principe(s) actif(s) –PA-, cette formulation :
- 30 ○ étant liquide en atmosphère ambiante ,
 - étant également liquide à la température et/ou au pH physiologiques et/ou en présence:
 - * d'électrolyte physiologique en concentration physiologique,
 - * et/ou d'au moins un tensioactif ,

- et comprenant une suspension colloïdale, aqueuse, de basse viscosité, à base de particules submicroniques de polymère PO biodégradable, hydrosoluble et porteur de groupements hydrophobes GH, lesdit es particules étant associées de façon non covalente avec au moins un principe actif PA et le milieu dispersif de la suspension étant essentiellement constitué par de l'eau,

caractérisée en ce que sa concentration en [PO] est fixée à une valeur suffisamment élevée pour permettre la formation de dépôt gélifié *in vitro*, après injection parentérale, en présence d'au moins une protéine.

10 **- 4 -** Formulation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que sa concentration en [PO] est telle que:

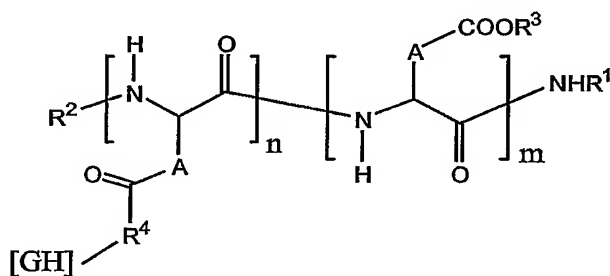
- $[PO] \geq 0,9.C1$,
- de préférence $20.C1 \geq [PO] \geq C1$,
- et mieux encore $10.C1 \geq [PO] \geq C1$

15 avec C1 représentant la concentration de " *gélification induite* " des particules de PO telle que
mesurée dans un test GI.

- 5 - Formulation selon l'une ou l'autre des revendications précédentes, caractérisée en ce que sa viscosité à 25 °C est inférieure ou égale à 5 Pa.s.

- 6 - Formulation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polymère PO est un polyaminoacide formé par des unités aspartiques et/ou des unités glutamiques, au moins une partie de ces unités étant porteuses de greffons comportant au moins un groupement hydrophobe (GH).

- 7 - Formulation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le (ou les) PO sont définis par la formule générale (I) suivante :

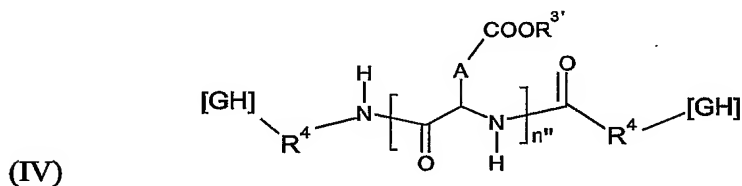
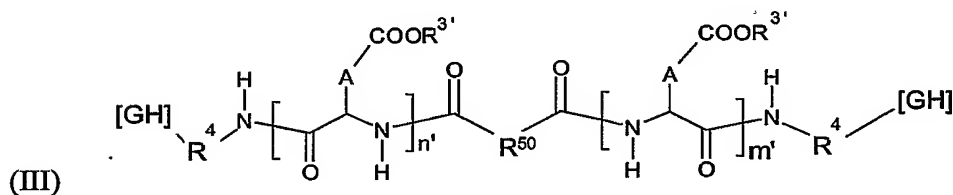
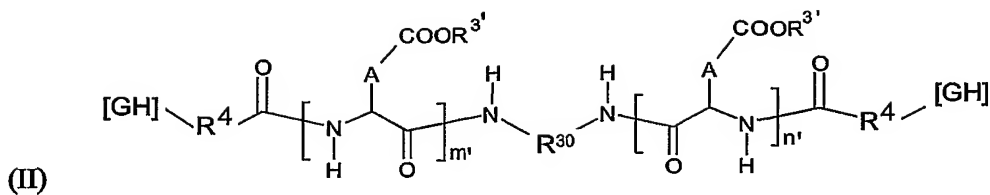


(I)

dans laquelle :

- R^1 représente un H, un alkyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, benzyle, une unité acide aminé terminale ou $-R^4-[GH]$;
- R^2 représente un H, un groupe acyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, un pyroglutamate ou $-R^4-[GH]$;
- R^3 est un H ou une entité cationique, de préférence sélectionnée dans le groupe comprenant :
 - les cations métalliques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant : le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium,
 - les cations organiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant :
 - les cations à base d'amine,
 - les cations à base d'oligoamine,
 - les cations à base de polyamine (la polyéthylèneimine étant particulièrement préférée),
 - les cations à base d'acide(s) aminé(s) avantageusement choisis dans la classe comprenant les cations à base de lysine ou d'arginine,
 - ou les polyaminoacides cationiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant la polylysine ou l'oligolysine ;
- R^4 représente une liaison directe ou un "espaceur" à base de 1 à 4 unités acide aminé ;
- A représente indépendamment un radical $-CH_2-$ (unité aspartique) ou $-CH_2-CH_2-$ (unité glutamique) ;
- $n/(n+m)$ est défini comme le taux de greffage molaire et varie de 0,5 à 100 % molaire ;
- $n/(n+m)$ est défini comme le taux de greffage molaire et sa valeur est suffisamment basse pour que PO mis en solution dans l'eau à pH 7 et à 25 °C, forme une suspension colloïdale de particules submicroniques de PO, de préférence $n/(n+m)$ est compris entre 1 à 25 % molaire et mieux encore entre 1 et 15 % molaire;
- $n+m$ varie de 10 à 1000, de préférence entre 50 et 300 ;
- GH représente un groupement hydrophobe .

- 8 - Formulation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le (ou les) PO répond à l'une des formules générales (II), (III) et (IV) suivantes :

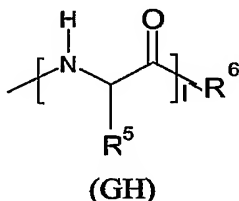


dans lesquelles :

- GH représente un groupement hydrophobe ;
- R^{30} est un groupement alkyle linéaire en C2 à C6 ;
- $R^{3'}$ est un H ou une entité cationique, de préférence sélect ionnée dans le groupe comprenant :
 - les cations métalliques avantageusement choisis dans le sous -groupe comprenant : le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium,
 - les cations organiques avantageusement choisis dans le sous -groupe comprenant :
 - les cations à base d'amine,
 - les cations à base d'oligoamine,
 - les cations à base de polyamine (la polyéthylèneimine étant particulièrement préférée),
 - les cations à base d'acide(s) aminé(s) avantageusement choisis dans la classe comprenant les cations à base de lysine ou d'arginine,
 - ou les polyaminoacides cationiques avantageusement choisis dans le sous -groupe comprenant la polylysine ou l'oligolysine,
- R^{50} est un groupement alkyle, dialcoxy ou diamine en C2 à C6 ;

- R^4 représente une liaison directe ou un "espaceur" à base de 1 à 4 unités acide aminé ;
- A représente indépendamment un radical $-\text{CH}_2-$ (unité aspartique) ou $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (unité glutamique) ;
- 5 ▪ $n' + m'$ ou n'' est défini comme le degré de polymérisation et varie de 10 à 1000, de préférence entre 50 et 300.

- 9 - Formulation selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce que les n groupements GH du PO représentent chacun indépendamment les uns des autres un radical monovalent de
10 formule suivante :



15 dans laquelle :

- R^5 représente un méthyle(alanine), isopropyle (valine), isobutyle (leucine), secbutyle (isoleucine), benzyle (phénylalanine) ;
- R^6 représente un radical hydrophobe comportant de 6 à 30 atomes de carbone ;
- 20 - l varie de 0 à 6.

- 10 - Formulation selon la revendication 9, caractérisée en ce que tout ou partie des radicaux hydrophobes R^6 des PO sont choisis de façon indépendante dans le groupe de radicaux comportant :

- 25 ▪ un alcoxy linéaire ou ramifié comportant de 6 à 30 atomes de carbone et pouvant comporter au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S) et/ou au moins une insaturation,
- un alcoxy comportant 6 à 30 atomes de carbone et ayant un ou plusieurs carbocycles annelés et contenant éventuellement au moins une insaturation et/ou au moins un hétéroatome (de préférence O et/ou N et/ou S),
- 30

- un alcoxyaryle ou un aryloxyalkyle de 7 à 30 atomes de carbone et pouvant comporter au moins une insaturation et/ou au moins un hétéro-atome (de préférence O et/ou N et/ou S).
- 5 - 11 - Formulation selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que le radical hydrophobe R⁶ du greffon du PO est issu d'un précurseur alcoolique choisi dans le groupe comprenant: l'octanol, le dodécanol, le tétradécanol, l'hexadécanol, l'octadécanol, l'oleylalcool, le tocophérol ou le cholestérol.
- 10 - 12 - Formulation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le PO est constitué d'un homopolymère d'alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-glutamique.
- 13 - Formulation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le PO est constitué d'un homopolymère d'alpha-L-aspartate ou d'alpha-L-aspartique.
- 15 - 14 - Formulation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le PO est constitué d'un copolymère d'alpha-L-aspartate/alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-aspartique/alpha-L-glutamique.
- 20 - 15 - Formulation selon la revendication 14, caractérisée en ce que dans le PO, la distribution des unités aspartiques et/ou glutamiques porteuses de greffons comportant au moins un motif GH est telle que le polymère ainsi constitué est soit aléatoire, soit de type bloc, soit de type multibloc.
- 25 - 16 - Formulation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la masse molaire du PO se situe entre 2 000 et 100 000 g/mole, et de préférence entre 5 000 et 40 000 g/mole.
- 17 - Formulation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le radical hydrophobe R⁶ du greffon du PO est issu d'un précurseur alcoolique formé par le tocophérol et en ce que :
- 30 ♦ $1 \% \leq [n / (n+m)] \times 100 \leq 10 \%$
 ♦ de préférence $3,5 \% \leq [n / (n+m)] \times 100 \leq 7,5 \%$
 ♦ n + m varie de 100 à 400, de préférence entre 120 et 300.
- 18 - Formulation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le radical hydrophobe R⁶ du greffon du PO est issu d'un précurseur alcoolique formé par le cholestérol:
- 35

- ♦ $1 \% \leq [n / (n+m)] \times 100 \leq 10 \%$
- ♦ de préférence $3,5 \% \leq [n / (n+m)] \times 100 \leq 6,5 \%$
- ♦ $n + m$ varie de 100 à 400, de préférence entre 120 et 300.

5 - 19 - Formulation selon la revendication 17 ou 18, caractérisée en ce que la concentration en polymère [PO] est comprise entre 15 et 50 mg/ml.

- 20 - Formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisée en ce que sa viscosité à 25 °C est inférieure ou égale à 5 Pa.s

10

- 21 - Formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisée en ce que les polymères modifiés hydrophobes PO sont sélectionnés dans le groupe comprenant: les polyaminoacides, les polysaccharides –de préférence dans le sous-groupe comprenant les pullulanes et/ou les chitosans et/ou les mucopolysaccharides-, les gélatines ou leurs mélanges.

15

- 22 - Formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, caractérisée en ce que sa fraction massique en interféron(s) non associée(s) aux particules submicroniques [interféron(s) non associée(s)] en % en poids est telle que :

- [interféron(s) non associée(s)] ≤ 1
- de préférence [interféron(s) non associée(s)] $\leq 0,5$.

20

- 23 - Formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, caractérisée en ce que l'interféron est l'interféron alpha.

25 - 24 - Formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, caractérisée en ce que le (ou les) principe(s) actif(s) supplémentaire(s) autre que l'(ou les)interleukine(s) est une protéine, une glycoprotéine, une protéine liée à une ou plusieurs chaînes polyalkylèneglycol [de préférence polyéthylèneglycol (PEG) : "protéine-PEGylée"], un polysaccharide, un liposaccharide, un oligonucléotide, un polynucléotide ou un peptide, ce (ou ces) principe(s)

30 actif(s) supplémentaire(s) étant de préférence sélectionné(s) parmi les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les cytokines, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ou leurs mélanges.

- 25 - Formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, caractérisée en ce qu'elle est injectable par voie parentérale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou dans une tumeur.
- 5 - 26 - Formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 25, caractérisée en ce qu'elle est destinée à la préparation de médicaments, en particulier pour administration parentérale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou dans une tumeur, voire par voie orale, nasale, vaginale ou oculaire.
- 10 - 27 - Procédé de préparation de médicaments, en particulier pour administration parentérale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou dans une tumeur, voire par voie orale, nasale, vaginale ou oculaire, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mettre en œuvre au moins une formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 26.
- 15 - 28 - Produit dérivé caractérisé en ce qu'il comprend des particules submicroniques, formées par des associations non covalentes PO/PA telles que définies dans la revendication 1 et en ce qu'il est obtenu à partir de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 26.
- 20 - 29 - Produit dérivé selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il est constitué par une poudre ou par un gel.
- 30 - Procédé de préparation de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 26, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement :
- 25
- ♦ à mettre en œuvre une suspension colloïdale de nanoparticules d'au moins un PO,
 - ♦ à mélanger cette suspension colloïdale de nanoparticules de PO avec au moins un interféron (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels), de préférence en solution aqueuse,
 - 30 ♦ à ajouter éventuellement au moins un excipient,
 - ♦ au besoin à ajuster le pH et/ou l'osmolarité,
 - ♦ éventuellement à filtrer la suspension ainsi obtenue.

- 31 - Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le (ou les) PA(s) est sous forme de suspension ou de solution aqueuse pour le mélange avec la suspension colloïdale de nanoparticules de PO.
- 5 - 32 - Procédé de préparation de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 26, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement :
- ♦ à mettre en œuvre une poudre d'au moins un polymère PO,
 - ♦ à mélanger cette poudre avec une suspension ou solution aqueuse d'au moins un interféron (et un ou plusieurs autres principe(s) actif(s) éventuels), de préférence en solution aqueuse,
 - 10 ♦ à ajouter éventuellement au moins un excipient,
 - ♦ au besoin à ajuster le pH et/ou l'osmolarité et,
 - ♦ éventuellement à filtrer la suspension ainsi obtenue.
- 15 - 33 - Procédé de préparation de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 26, caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement :
- ♦ à mettre en œuvre une poudre issue du séchage de la formulation liquide selon l'une quelconque des revendications 1 à 26,
 - ♦ à mélanger cette poudre avec un milieu liquide aqueux, préférence sous agitation,
 - 20 ♦ à ajouter éventuellement au moins un excipient,
 - ♦ au besoin à ajuster le pH et/ou l'osmolarité et,
 - ♦ éventuellement à filtrer la suspension ainsi obtenue.
- 34 - Procédé de préparation d'une poudre dérivée de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 26, caractérisé en ce que la dite poudre est obtenue par séchage de la formulation selon l'une quelconque des revendications 1 à 26.
- 25

1 / 1

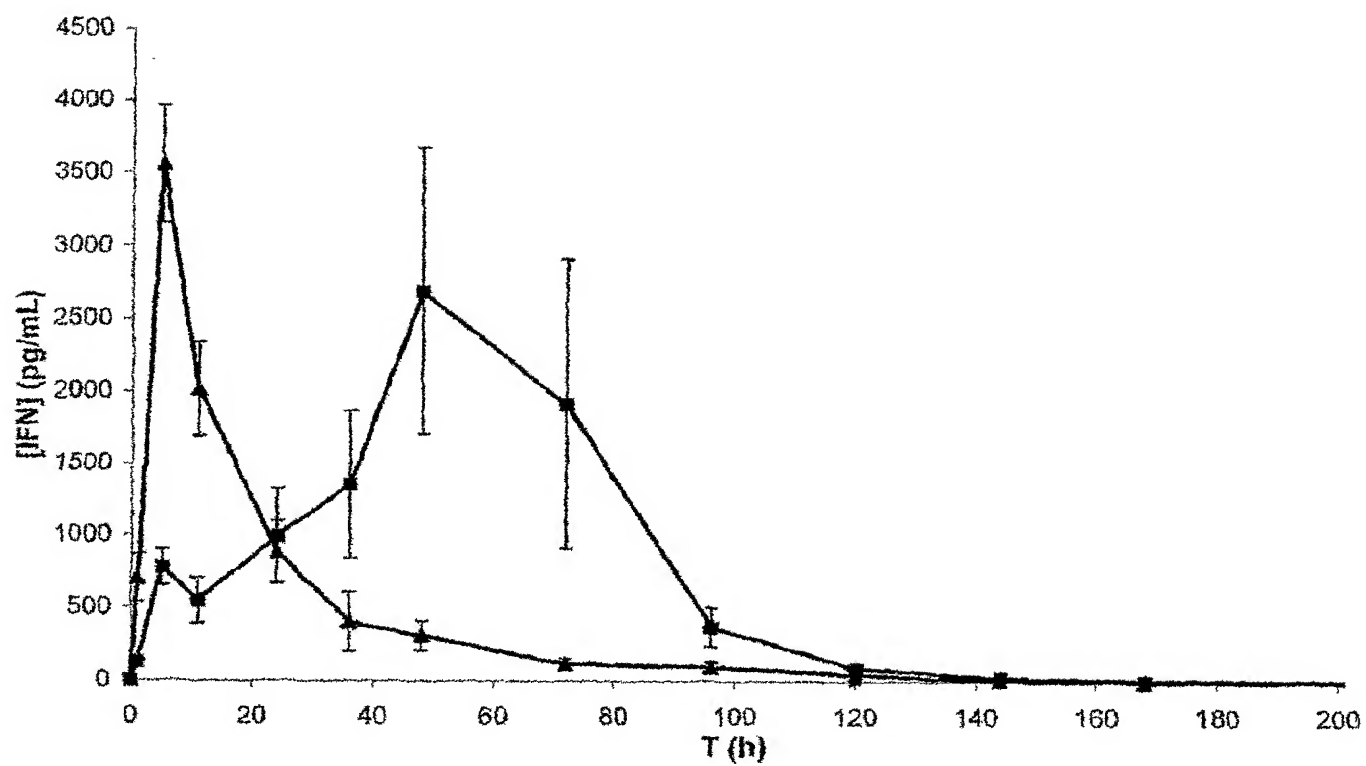


FIG.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/050605

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/21 A61K9/10 A61P35/00 A61K47/48 A61K9/14
A61K38/20 A61K47/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, FSTA, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 786 098 A (FLAMEL TECH SA) 26 May 2000 (2000-05-26) cited in the application page 1, lines 1-16 page 4, line 8 - page 8, line 10 page 13, line 3	1,6-9, 12-16, 21,24-34
X	FR 2 732 218 A (FLAMEL TECH SA) 4 October 1996 (1996-10-04) page 1, lines 1-15 page 6, line 14 - page 9, line 30 page 11, lines 8-15 page 17, line 25 ----- -/--	1,6-9, 12-16, 21,24-34

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 March 2005

Date of mailing of the international search report

16/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

HOUYVET, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/050605

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 801 226 A (FLAMEL TECH SA) 25 May 2001 (2001-05-25) cited in the application page 1, lines 1-29 page 7, line 15 - page 8, line 12 page 16, line 20 page 17, lines 1-3	1,6-9, 12-16, 21,24-34
X	FR 2 822 834 A (FLAMEL TECH SA) 4 October 2002 (2002-10-04) page 1, lines 4-20 page 9, line 19 - page 10, line 20 page 12, lines 1-27 page 13, lines 26-30 page 14, lines 1-7 page 16, lines 10-17 page 23, line 35	1,6-9, 12-16, 21,24-34
X	FR 2 838 964 A (FLAMEL TECH SA) 31 October 2003 (2003-10-31) page 1, lines 4-27 page 7, lines 27-33 page 9, lines 9-11 page 14, line 29	1,6-8, 12-16, 21,24-34
X	WO 99/18142 A (MACROMED INC) 15 April 1999 (1999-04-15) cited in the application page 1, lines 6-26 page 21, line 19	1-3,16, 24-34
P,X	WO 03/104303 A (CHAN YOU-PING ; ANGOT STEPHANIE (FR); BREYNE OLIVIER (FR); FLAMEL TECH) 18 December 2003 (2003-12-18) page 1, lines 4-19 page 5, line 5 - page 6, line 15 page 7, line 23 - page 8, lines 3,25-30 page 11, lines 7-26 page 14, line 20; example 1	1-34
P,X	WO 2004/013206 A (CHAN YOU-PING ; ANGOT STEPHANIE (FR); BREYNE OLIVIER (FR); FLAMEL TECH) 12 February 2004 (2004-02-12) page 1, lines 5-20 page 4, lines 18-23 page 5, lines 1-8,24 - page 7, line 28 page 8, lines 10-19 page 12, line 26	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/050605

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2786098	A	26-05-2000	FR 2786098 A1	26-05-2000
			AU 1278000 A	13-06-2000
			EP 1131056 A1	12-09-2001
			WO 0030618 A1	02-06-2000
			JP 2002530323 T	17-09-2002
			US 6630171 B1	07-10-2003
FR 2732218	A	04-10-1996	FR 2732218 A1	04-10-1996
			AT 194490 T	15-07-2000
			AU 706746 B2	24-06-1999
			AU 5337796 A	16-10-1996
			BR 9607863 A	30-06-1998
			CA 2215254 A1	03-10-1996
			CN 1183040 A	27-05-1998
			DE 69609222 D1	17-08-2000
			DE 69609222 T2	22-03-2001
			DK 734720 T3	06-11-2000
			EP 0734720 A1	02-10-1996
			ES 2151138 T3	16-12-2000
			WO 9629991 A1	03-10-1996
			GR 3034613 T3	31-01-2001
			IN 185295 A1	23-12-2000
			JP 11503118 T	23-03-1999
			NZ 305392 A	26-08-1998
			PT 734720 T	29-12-2000
			US 5904936 A	18-05-1999
			ZA 9602446 A	07-08-1996
FR 2801226	A	25-05-2001	FR 2801226 A1	25-05-2001
			AT 247460 T	15-09-2003
			AU 7798600 A	04-06-2001
			BR 0015690 A	09-07-2002
			CA 2391986 A1	31-05-2001
			CN 1399541 A	26-02-2003
			DE 60004704 D1	25-09-2003
			DE 60004704 T2	08-07-2004
			DK 1239836 T3	24-11-2003
			EP 1239836 A1	18-09-2002
			ES 2206311 T3	16-05-2004
			WO 0137809 A1	31-05-2001
			JP 2003514844 T	22-04-2003
			MX PA02005191 A	22-09-2003
			PT 1239836 T	30-01-2004
			ZA 200203618 A	07-05-2003
FR 2822834	A	04-10-2002	FR 2822834 A1	04-10-2002
			BR 0208605 A	09-03-2004
			CA 2442532 A1	10-10-2002
			EP 1372618 A1	02-01-2004
			WO 02078677 A1	10-10-2002
			JP 2004525939 T	26-08-2004
			MX PA03009007 A	17-02-2004
			US 2004138095 A1	15-07-2004
FR 2838964	A	31-10-2003	FR 2838964 A1	31-10-2003
			AU 2003249153 A1	10-11-2003
			WO 03090727 A1	06-11-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/050605

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918142	A	15-04-1999	US 6004573 A	21-12-1999
			US 6117949 A	12-09-2000
			AU 736812 B2	02-08-2001
			AU 9678098 A	27-04-1999
			BR 9815239 A	11-12-2001
			CA 2305621 A1	15-04-1999
			CN 1282345 A	31-01-2001
			EP 1034207 A1	13-09-2000
			JP 2002516910 T	11-06-2002
			TR 200000900 T2	21-08-2000
			WO 9918142 A1	15-04-1999
			US 6201072 B1	13-03-2001
			ZA 9809009 A	14-06-1999
			AU 758475 B2	20-03-2003
			AU 1098300 A	17-04-2000
			BR 9914258 A	03-07-2001
			CA 2345659 A1	06-04-2000
			CN 1324374 A	28-11-2001
			EP 1141079 A1	10-10-2001
			JP 2002525404 T	13-08-2002
			NO 20011639 A	30-03-2001
			NZ 510832 A	25-10-2002
			PL 346963 A1	11-03-2002
			RU 2232779 C2	20-07-2004
			TR 200100900 T2	22-10-2001
			WO 0018821 A1	06-04-2000
			ZA 200102453 A	28-09-2001
WO 03104303	A	18-12-2003	FR 2840614 A1	12-12-2003
			CA 2486944 A1	18-12-2003
			WO 03104303 A1	18-12-2003
WO 2004013206	A	12-02-2004	FR 2843117 A1	06-02-2004
			WO 2004013206 A2	12-02-2004

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/050605

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K38/21 A61K9/10 A61P35/00 A61K47/48 A61K9/14 A61K38/20 A61K47/42		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61P A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EP0-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, FSTA, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 786 098 A (FLAMEL TECH SA) 26 mai 2000 (2000-05-26) cité dans la demande page 1, ligne 1-16 page 4, ligne 8 - page 8, ligne 10 page 13, ligne 3 -----	1,6-9, 12-16, 21,24-34
X	FR 2 732 218 A (FLAMEL TECH SA) 4 octobre 1996 (1996-10-04) page 1, ligne 1-15 page 6, ligne 14 - page 9, ligne 30 page 11, ligne 8-15 page 17, ligne 25 ----- -/-	1,6-9, 12-16, 21,24-34
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">8 mars 2005</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">16/03/2005</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">HOUYVET, C</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/050605

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 801 226 A (FLAMEL TECH SA) 25 mai 2001 (2001-05-25) cité dans la demande page 1, ligne 1-29 page 7, ligne 15 - page 8, ligne 12 page 16, ligne 20 page 17, ligne 1-3 -----	1,6-9, 12-16, 21,24-34
X	FR 2 822 834 A (FLAMEL TECH SA) 4 octobre 2002 (2002-10-04) page 1, ligne 4-20 page 9, ligne 19 - page 10, ligne 20 page 12, ligne 1-27 page 13, ligne 26-30 page 14, ligne 1-7 page 16, ligne 10-17 page 23, ligne 35 -----	1,6-9, 12-16, 21,24-34
X	FR 2 838 964 A (FLAMEL TECH SA) 31 octobre 2003 (2003-10-31) page 1, ligne 4-27 page 7, ligne 27-33 page 9, ligne 9-11 page 14, ligne 29 -----	1,6-8, 12-16, 21,24-34
X	WO 99/18142 A (MACROMED INC) 15 avril 1999 (1999-04-15) cité dans la demande page 1, ligne 6-26 page 21, ligne 19 -----	1-3, 16, 24-34
P,X	WO 03/104303 A (CHAN YOU-PING ; ANGOT STEPHANIE (FR); BREYNE OLIVIER (FR); FLAMEL TECH) 18 décembre 2003 (2003-12-18) page 1, ligne 4-19 page 5, ligne 5 - page 6, ligne 15 page 7, ligne 23 - page 8, ligne 3,25-30 page 11, ligne 7-26 page 14, ligne 20; exemple 1 -----	1-34
P,X	WO 2004/013206 A (CHAN YOU-PING ; ANGOT STEPHANIE (FR); BREYNE OLIVIER (FR); FLAMEL TECH) 12 février 2004 (2004-02-12) page 1, ligne 5-20 page 4, ligne 18-23 page 5, ligne 1-8,24 - page 7, ligne 28 page 8, ligne 10-19 page 12, ligne 26 -----	1-34

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/050605

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2786098	A	26-05-2000	FR 2786098 A1	26-05-2000
			AU 1278000 A	13-06-2000
			EP 1131056 A1	12-09-2001
			WO 0030618 A1	02-06-2000
			JP 2002530323 T	17-09-2002
			US 6630171 B1	07-10-2003
FR 2732218	A	04-10-1996	FR 2732218 A1	04-10-1996
			AT 194490 T	15-07-2000
			AU 706746 B2	24-06-1999
			AU 5337796 A	16-10-1996
			BR 9607863 A	30-06-1998
			CA 2215254 A1	03-10-1996
			CN 1183040 A	27-05-1998
			DE 69609222 D1	17-08-2000
			DE 69609222 T2	22-03-2001
			DK 734720 T3	06-11-2000
			EP 0734720 A1	02-10-1996
			ES 2151138 T3	16-12-2000
			WO 9629991 A1	03-10-1996
			GR 3034613 T3	31-01-2001
			IN 185295 A1	23-12-2000
			JP 11503118 T	23-03-1999
			NZ 305392 A	26-08-1998
			PT 734720 T	29-12-2000
			US 5904936 A	18-05-1999
			ZA 9602446 A	07-08-1996
FR 2801226	A	25-05-2001	FR 2801226 A1	25-05-2001
			AT 247460 T	15-09-2003
			AU 7798600 A	04-06-2001
			BR 0015690 A	09-07-2002
			CA 2391986 A1	31-05-2001
			CN 1399541 A	26-02-2003
			DE 60004704 D1	25-09-2003
			DE 60004704 T2	08-07-2004
			DK 1239836 T3	24-11-2003
			EP 1239836 A1	18-09-2002
			ES 2206311 T3	16-05-2004
			WO 0137809 A1	31-05-2001
			JP 2003514844 T	22-04-2003
			MX PA02005191 A	22-09-2003
			PT 1239836 T	30-01-2004
			ZA 200203618 A	07-05-2003
FR 2822834	A	04-10-2002	FR 2822834 A1	04-10-2002
			BR 0208605 A	09-03-2004
			CA 2442532 A1	10-10-2002
			EP 1372618 A1	02-01-2004
			WO 02078677 A1	10-10-2002
			JP 2004525939 T	26-08-2004
			MX PA03009007 A	17-02-2004
			US 2004138095 A1	15-07-2004
FR 2838964	A	31-10-2003	FR 2838964 A1	31-10-2003
			AU 2003249153 A1	10-11-2003
			WO 03090727 A1	06-11-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2004/050605

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9918142	A	15-04-1999	US 6004573 A	21-12-1999
			US 6117949 A	12-09-2000
			AU 736812 B2	02-08-2001
			AU 9678098 A	27-04-1999
			BR 9815239 A	11-12-2001
			CA 2305621 A1	15-04-1999
			CN 1282345 A	31-01-2001
			EP 1034207 A1	13-09-2000
			JP 2002516910 T	11-06-2002
			TR 200000900 T2	21-08-2000
			WO 9918142 A1	15-04-1999
			US 6201072 B1	13-03-2001
			ZA 9809009 A	14-06-1999
			AU 758475 B2	20-03-2003
			AU 1098300 A	17-04-2000
			BR 9914258 A	03-07-2001
			CA 2345659 A1	06-04-2000
			CN 1324374 A	28-11-2001
			EP 1141079 A1	10-10-2001
			JP 2002525404 T	13-08-2002
			NO 20011639 A	30-03-2001
			NZ 510832 A	25-10-2002
			PL 346963 A1	11-03-2002
			RU 2232779 C2	20-07-2004
			TR 200100900 T2	22-10-2001
			WO 0018821 A1	06-04-2000
			ZA 200102453 A	28-09-2001
WO 03104303	A	18-12-2003	FR 2840614 A1	12-12-2003
			CA 2486944 A1	18-12-2003
			WO 03104303 A1	18-12-2003
WO 2004013206	A	12-02-2004	FR 2843117 A1	06-02-2004
			WO 2004013206 A2	12-02-2004